



# Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique et des membranes des organites cellulaires par des agents chimiques et physiques

Marie-Amélie De de Ménorval Ménorval

## ► To cite this version:

Marie-Amélie De de Ménorval Ménorval. Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique et des membranes des organites cellulaires par des agents chimiques et physiques. Biologie moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114840 . tel-01164983

**HAL Id: tel-01164983**

**<https://theses.hal.science/tel-01164983>**

Submitted on 18 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Paris-Sud

Ecole doctorale : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ED425)

Pôle : Pharmacotechnie et physico-chimie pharmaceutique

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Laboratoire : UMR 8203 Vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses

## Thèse de doctorat

Soutenue le 25 novembre 2013

par

**Marie-Amélie De MÉNORVAL**

Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique et des membranes des organites cellulaires par des agents chimiques et physiques

Directeur de thèse :	Lluis M. Mir	Directeur de Recherche CNRS (UMR 8203)
Rapporteurs :	Marie-Pierre Rols	Directrice de recherche CNRS (UMR 5089)
	Thomas Vernier	Research professor (ODU, USA)
Examineurs :	Damijan Miklavcic	Professeur (Université de Ljubljana, Slovénie)
	Hervé Petite	Professeur (UMR 7052)
	Ramon Reigada	Professeur (Université de Barcelone, Espagne)



Série doctorat : 1260





# **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, Madame Marie-Pierre Rols, Directrice de recherche au CNRS et Monsieur Tomas Vernier, Professeur à l'ODU, d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance. Je remercie aussi les Professeur Hervé Petite (président du jury) et Ramon Reigada pour m'avoir fait l'honneur de leur présence dans mon jury ainsi que le Professeur Damijan Miklavcic pour avoir accepté d'examiner mon travail même s'il n'a pu être présent le jour de la soutenance.

Je tiens aussi à exprimer mes plus profonds remerciements à Monsieur Lluís Mir, Directeur de recherche du CNRS et directeur de l'UMR 8203 pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir permis de réaliser mes trois ans de doctorat dans les meilleures conditions. Un grand merci pour tout le temps que vous m'avez consacré malgré votre emploi du temps très chargé et pour les nombreuses conférences auxquelles j'ai pu assister et pendant lesquelles j'ai pu faire des rencontres passionnantes et apprendre énormément.

Tout au long de ces trois ans, j'ai eu conscience de la chance que j'ai eu de réaliser mon doctorat dans une si bonne ambiance et c'est pour cela que je remercie avec émotion tous mes collègues avec qui j'ai partagé une période de ma vie à la fois très courte et très longue de ma vie :

Isabelle, pour les escapades piscines, les repas à Paul Brousse, notre semaine en Slovénie (n'oublions pas nos souvenirs de la recherche de Planina) et toutes nos discussions qui nous permettaient de relâcher la pression quand il le fallait.

Marie, pour m'avoir tenu compagnie tout ce temps dans le bureau des « Maries », pour les cinés entre filles et pour toutes nos conversations diverses et variées.

Christophe, bien sûr pour tes « Christophades », ton grand calme, ton soutien et ta faculté à écouter mes craquages. Bon courage pour les derniers mois de doctorat. Je suis pressée de venir assister à ta soutenance.

Aude, pour tes conseils en électricité, ta disponibilité, pour m'avoir initiée au FID et au LeCroy, pour les folles soirées durant les conférences et pour tes blagues de geek.

Franck, pour toutes nos réflexions métaphysiques sur le fonctionnement de la cellule et sur nos expériences, pour tes conseils avisés et pour ta bonne humeur de tous les jours.

Léa, pour m'avoir appris à faire des morpions sur les iPS, pour nos échanges musicaux, pour ton sourire constant et ta gentillesse.

Tous les autres membres de l'UMR 8203 pour votre aide et vos conseils.



Je remercie aussi toutes les personnes que j'ai côtoyées moins longtemps mais que je n'oublierai pas : Céline, Geoffrey, Marie pour les délires et le soutien, Bassim pour ton incroyable force de tous les jours, Jean-Rémi pour toute l'aide au microscope, Anna, Antoine, Najat, Aleksandra, Hafiz, Giorgia et Roxane pour votre bonne humeur.

Un grand merci aussi à Isabelle, notre gestionnaire hors pair, à Sophie de la plateforme de microscopie, à tous les étrangers qui ont partagé la vie de notre labo et qui y ont apporté une touche internationale : Mohamed, l'américano-marocain, les italiens Fabrizio et Agnese, les espagnols Quim et Tomas, Mihaela, la roumaine, Aaron, l'irlandais, Mindaugas, le lituanien et à tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé et dont l'aide a été précieuse : Zidong, Delong et Nilo.

Comme cette thèse ne s'est pas faite qu'avec les personnes du laboratoire, je tiens à remercier chaleureusement tous les collaborateurs avec qui j'ai travaillé : Brigitte, Thomas et Michael de l'ONERA, Ramon de Barcelone, Claire de l'ENS et son équipe, Clair de l'INRIA, Mounir de Nancy, les membres d'ISTEM, de l'UMR 7052 de Lariboisière et de l'UMR 7365 à Nancy.

J'ai une pensée toute particulière pour tous mes amis qui ont entrepris la même aventure que moi en faisant un doctorat et qui comprennent si bien les bons moments ainsi que les plus durs de cette expérience et qui grossiront dans très peu de temps les rangs des docteurs : Rosa « la catastrophe » pour tous les bons moments qu'on a partagés ici et ailleurs en découvrant le monde de la recherche et en dehors, Cécilia la rageuse mais qui sait aussi m'impressionner par son calme dans certaines circonstances, ainsi que Guillaume, Delphine et Stéphane.

Merci aussi à mes parents, mon beau-père, mon frère, ma sœur et mon grand-père, sans qui je ne serais jamais arrivée jusque-là, ainsi qu'à mon amie de longue date, Ophélie qui a toujours été là pour moi. Pour finir, je remercie Arnaud, ma moitié, pour m'avoir supporté (dans les deux sens du terme) pendant toute cette période, pour ses explications en électricité et pour sa danse de Dewey, sa botte magique pour me faire sourire dans les moments de doutes.

# Table des matières

<b>Table des matières .....</b>	<b>5</b>
<b>Table des abréviations .....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction bibliographique.....</b>	<b>15</b>
<b>I. Les membranes cellulaires.....</b>	<b>17</b>
A. La membrane plasmique .....	17
1) Une structure délimitant la cellule et retrouvée dans tous les organismes vivants .....	17
2) Structure et composition biochimique de la membrane plasmique .....	18
a) Notions historiques .....	18
b) Les lipides .....	20
i. Les phospholipides.....	20
ii. Le cholestérol .....	21
iii. Le cas particulier des archées .....	24
c) Les protéines .....	26
d) Asymétries de la membrane plasmique .....	27
3) Une mosaïque fluide .....	28
4) Rôles de la membrane plasmique.....	31
a) Les rôles tenus par les lipides .....	31
i. Un rôle de barrière .....	31
ii. Un rôle structural .....	31
b) Les rôles tenus par les protéines.....	32
i. Un rôle de capteur et de transmetteur de signaux.....	32
ii. Un rôle structural .....	35
iii. Un rôle de filtre .....	37
5) La différence de potentiel transmembranaire de repos ou potentiel de membrane .....	39
B. Les membranes des organites .....	40
1) La compartimentation cellulaire chez les eucaryotes .....	40
2) Des différences de composition .....	42
3) Des membranes avec des rôles propres à chaque organite .....	44
C. Continuité des membranes cellulaires .....	45
1) Les cytosoles et les vésicules intracellulaires.....	45
2) Le rôle du cytosquelette dans le transport vésiculaire .....	49
D. Présence de radeaux lipidiques .....	50
<b>II. Perméabilisation de la membrane plasmique.....</b>	<b>51</b>
A. Observation de la perméabilisation de la membrane plasmique .....	51
1) Observation par techniques optiques .....	51
a) Marqueurs de petite taille .....	51
b) Marqueurs de taille moyenne .....	52
c) Marqueurs de grande taille .....	53

2)	Observation par technique électrique .....	54
3)	Notion de perméabilisation à une molécule donnée .....	54
B.	Perméabilisation par des agents chimiques.....	55
1)	Les polyéthylènes glycols .....	55
a)	Structure .....	55
a)	Utilisations en biologie .....	56
b)	Mode d'action .....	57
2)	Le Diméthylsulfoxyde .....	57
a)	Structure .....	57
b)	Utilisations en biologie .....	57
c)	Mode d'action dans le cadre de la perméabilisation membranaire .....	58
C.	Perméabilisation par des agents physiques.....	60
1)	La sonoporation .....	61
2)	L'électroporation et de l'électroperméabilisation .....	62
a)	Principe .....	62
b)	Les différentes impulsions électriques utilisées .....	63
i.	Les impulsions milliseconde .....	63
ii.	Les impulsions microseconde .....	64
iii.	Les impulsions nanoseconde .....	64
c)	Combinaison et comparaison des impulsions HV et LV et optimisation .....	64
3)	Les mécanismes de l'électroporation et de l'électroperméabilisation .....	66
a)	La modification de la différence de potentiel transmembranaire.....	67
b)	Le seuil de perméabilisation et la rupture de la membrane .....	70
i.	Influence de l'intensité du champ électrique .....	71
ii.	Influence de la taille et de la géométrie des objets perméabilisés.....	71
iii.	Influence de la durée des impulsions appliquées .....	73
iv.	Influence des lipides composant la bicouche lipidique .....	74
v.	Valeurs de seuils de perméabilisation.....	75
c)	L'état perméabilisé de la membrane .....	76
i.	Influence de l'augmentation du champ électrique au-dessus du seuil de perméabilisation .....	76
ii.	Electroporation et formation de pores ou la théorie initiale.....	76
iii.	Electroperméabilisation et modifications des propriétés physico-chimiques de la bicouche lipidique.....	80
d)	La réparation de la membrane .....	81
e)	Effet des impulsions microseconde sur les structures cellulaires internes .....	82
D.	Les applications de la perméabilisation membranaire .....	83
1)	Le transfert de gènes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	83
a)	Principe .....	83
b)	Historique.....	84

c)	Applications .....	86
i.	Transfert de gènes rapporteurs.....	86
ii.	Thérapie génique .....	87
iii.	Vaccins à ADN .....	89
iv.	Génération de cellules souches .....	90
2)	Le transfert de médicaments : l'électrochimiothérapie.....	92
a)	Historique.....	92
b)	Mécanisme d'action de la bléomycine et du cisplatine.....	94
i.	La bléomycine .....	94
ii.	Le cisplatine .....	95
c)	Applications actuelles en clinique.....	96
d)	Essais cliniques en cours .....	97
3)	L'électrofusion cellulaire .....	99
a)	Historique.....	99
b)	Principe .....	100
c)	Applications .....	102
<b>III.</b>	<b>Perméabilisation des membranes cellulaires internes et externes par des impulsions électriques ultracourtes.....</b>	<b>107</b>
A.	Les impulsions nanosecondes .....	107
1)	Génération des impulsions nanosecondes .....	107
a)	Générateurs utilisés pour les impulsions nanosecondes .....	108
i.	Générateurs d'impulsions à ligne de transmission .....	108
ii.	Générateur de Marx .....	109
iii.	Générateur Blumlein .....	110
iv.	Transformateurs à lignes de transmission .....	110
b)	Les commutateurs utilisés pour les impulsions nanosecondes .....	110
i.	Les éclateurs .....	110
ii.	Les semi-conducteurs .....	111
iii.	Les photoconducteurs .....	112
2)	Les systèmes d'exposition pour les impulsions nanosecondes.....	112
a)	Les électrodes à plaques parallèles .....	112
i.	Les cuvettes .....	112
ii.	Les électrodes à plaques parallèles utilisées in vivo .....	113
b)	Les électrodes à aiguilles .....	113
i.	Les électrodes utilisées in vitro .....	113
ii.	Les électrodes utilisées in vivo.....	114
c)	Les microdispositifs .....	114
d)	Importance du métal utilisé à l'interface électrode/échantillon .....	115
3)	Effets des impulsions nanosecondes sur l'intérieur des cellules et sur la membrane plasmique.....	115

a)	Effets des impulsions nanosecondes sur la mitochondrie .....	117
b)	Effets des impulsions nanosecondes sur l'ADN contenu dans le noyau .....	117
c)	Effets des impulsions nanosecondes sur le réticulum endoplasmique .....	118
d)	Effet des impulsions nanosecondes sur la membrane plasmique .....	118
4)	Applications biologiques et perspectives thérapeutiques .....	119
a)	Traitement de mélanomes chez la souris .....	119
b)	Traitement de cellules cancéreuses humaines <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	119
5)	Conclusion .....	120
B.	Application des nanopulses : la génération de pics calciques .....	121
1)	Méthodes de détection .....	121
a)	Les marqueurs classique du calcium .....	121
b)	Un exemple de marqueur fluorescent du calcium : le Fluo-4 .....	122
2)	Les oscillations calciques spontanées .....	123
a)	Le phénomène physiologique .....	123
b)	Oscillations calciques spontanées dans un type cellulaire <i>in vitro</i> , les hMSC .....	124
i.	Les hMSC, des cellules adultes dérivées du mésoderme pouvant se différencier en plusieurs types cellulaires .....	124
ii.	La définition des hMSC .....	125
iii.	Les différentes origines des MSC .....	125
c)	Mécanismes des oscillations calciques spontanées .....	128
d)	Rôles des oscillations calciques spontanées .....	129
	<b>Objectifs de cette thèse .....</b>	<b>131</b>
	<b>Résultats expérimentaux .....</b>	<b>135</b>
	<b>Article 1 .....</b>	<b>137</b>
	<b>Article 2 .....</b>	<b>151</b>
	<b>Article 3 .....</b>	<b>161</b>
	<b>Discussion/Conclusions .....</b>	<b>185</b>
I.	<b>Comparaison entre méthode chimique/méthode physique de perméabilisation des membranes cellulaires .....</b>	<b>187</b>
A.	Ressemblance des structures de perméabilisation .....	188
B.	Notion de fin de la perturbation .....	189
C.	Différences de toxicité et d'efficacité entre la perméabilisation par le DMSO et celle par l'application d'un champ électrique .....	189
D.	Le DMSO n'entraîne pas, théoriquement, d'oxydation des lipides comme lors de l'électroperméabilisation .....	190
E.	Notion de perméabilisation à une molécule donnée et importance du système utilisé pour déterminer la perméabilisation .....	191
II.	<b>Génération de pics calciques par l'application de différents types d'impulsions électriques .....</b>	<b>192</b>
A.	Importance du dispositif d'exposition .....	192

1) Possibilité de travailler à des champs très élevés et de n'appliquer qu'une seule impulsion	192
2) Intérêt de pouvoir travailler avec des cellules adhérentes ou attachées .....	193
3) Importance de l'adaptation de l'impédance du système.....	193
B. Importance du type d'impulsion utilisée dans la génération de pics calciques .....	194
C. Perméabilisation de la membrane plasmique pour des champs électriques inférieurs à ceux nécessaires à la perméabilisation des organites .....	196
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>199</b>
<b>I. Cellules et conditions de culture .....</b>	<b>201</b>
A. DC-3F .....	201
B. HaMSC .....	201
<b>II. Microscopie .....</b>	<b>201</b>
A. Observation morphologique et mesure de la taille des cellules DC-3F exposées au DMSO	201
B. Observation des pics calciques induits par les impulsions nanosecondes sur les DC-3F ....	202
C. Observation des pics calciques induits par les impulsions nanosecondes sur les haMSC ...	202
<b>III. Cytométrie en flux.....</b>	<b>203</b>
A. Perméabilisation au $\text{Ca}^{2+}$ des cellules DC-3F en présence de DMSO .....	203
B. Perméabilisation au Yo-Pro des cellules DC-3F en présence de DMSO .....	204
<b>IV. Montages électriques .....</b>	<b>204</b>
A. Montage électrique du générateur à impulsions nanoseconde et mesure des impulsions ...	204
B. Montage électrique du générateur à impulsions microseconde.....	205
<b>V. Système d'exposition aux impulsions nanoseconde .....</b>	<b>205</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>207</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>225</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>227</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>241</b>
<b>Annexe 3.....</b>	<b>251</b>



# Table des abréviations

$\Delta E$ :	gradient électrochimique entre deux compartiments.
$\Delta G$ :	variation de l'énergie libre
$\Delta\psi_0$ :	différence de potentiel transmembranaire de repos
$\Delta\psi_i$ :	variation du potentiel transmembranaire induite par un champ électrique
$\Delta\psi_s$ :	seuil de perméabilisation
$\Delta\psi_t$ :	somme de $\Delta\psi_i$ et de $\Delta\psi_0$
$\epsilon_r$ :	permittivité relative du diélectrique utilisé dans une ligne de transmission
$\theta$ :	angle mesuré entre la position de la zone d'intérêt sur la cellule et la direction du champ électrique
$\lambda_0$ :	conductivité du milieu extracellulaire
$\lambda_i$ :	conductivité du cytoplasme
$\lambda_m$ :	conductivité de la membrane
$\tau_m$ :	constante caractéristique de temps de la membrane
$\tau_i$ :	constante caractéristique de temps de l'impulsion
$\tau$ :	temps de propagation d'une impulsion dans une ligne de transmission
A :	base adénine
AC :	Adénylate Cyclase
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AM :	groupements AcétoxyMéthyl
AMPc :	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
aMSC :	cellule souche mésenchymateuse issue du tissu adipeux ou adipose Mesenchymal Stem Cell en anglais
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP :	Adénosine Tri-Phosphate
Bcl-2 :	proteïn 2 du lymphoma à cellule B ou B-cell lymphoma 2 en anglais
bMSC :	cellule souche mésenchymateuse issue de la moelle osseuse ou bone marrow Mesenchymal Stem Cell en anglais
C :	base cytosine
$c$ :	vitesse de la lumière dans le vide
$C_0$ :	concentration du soluté à l'extérieur du compartiment
$C_A$ :	concentration du soluté dans le compartiment A
CAG :	gène de la beta-actine de poulet ou Chicken Beta-Actine Gene en anglais
$C_B$ :	concentration du soluté dans le compartiment B
CHO :	cellule d'Ovaire de Hamster Chinois ou Chinese Hamster Ovary cell en anglais
Chol :	Cholestérol
$C_i$ :	concentration du soluté à l'intérieur du compartiment
CL :	CardioLipine
$C_m$ :	capacitance de la membrane
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COPI :	protéine de manteau I ou COat Protein I en anglais
COPII :	protéine de manteau II ou COat Protein II en anglais
Cr-EDTA :	Chromure d'acide éthylène diamine tétraacétique ou EthyleneDiamineTetraacetic Acid en anglais
D :	durée de l'impulsion électrique
$d$ :	épaisseur de la membrane
DM :	Dynamique Moléculaire
DMEM :	milieu de Eagle modifié par Dulbelcco ou Dulbelcco's Modified Eagle Medium en anglais
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde



DOPC :	DiOleoylPhosphatidylCholine
DPhPC-ester :	DiPhytanoyl-PhosphoCholine-ester
DPhPC-éther :	DiPhytanoyl-PhosphoCholine-éther
DPPC :	DiPalmitoylPhosphatidylCholine
E :	amplitude du champ électrique
$E_{A/B}$ :	différence de potentiel entre les deux compartiments pour un ion donné
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ERG :	ERGostérol
F :	constante de Faraday
FRAP :	redistribution de la fluorescence après photoblanchiment ou Fluorescence Recovery After Photobleaching en anglais
G :	base guanine
GDP :	Guanosine Di-Phosphate
GFP :	protéine fluorescente verte ou Green Fluorescent Protein en anglais
GTP :	Guanosine Tri-Phosphate
GUV :	Giant Unilamellar Vesicles
haMSC :	cellule souche mésenchymateuse humaine issue du tissu adipeux ou human adipose Mesenchymal Stem Cell en anglais
hbMSC :	cellule souche mésenchymateuse humaine issue de la moelle osseuse ou human bone marrow Mesenchymal Stem Cell en anglais
hMSC :	cellule souche mésenchymateuse humaine ou human Mesenchymal Stem Cell en anglais
HV :	impulsion électrique de haut voltage ou High Voltage en anglais
IGBT :	transistor bipolaire à grille isolée ou Insulated Gate Bipolar Transistor en anglais
IL-2 :	InterLeukine-2
IP :	Iodure de Propidium
$IP_3$ :	Inositol 1, 4, 5-triPhosphate
$IP_3R$ :	Récepteur à Inositol 1, 4, 5-triPhosphate
iPS :	Cellules Souches Pluripotentes Induites ou Induced Pluripotent Stem cells en anglais
Klf4 :	facteur de traduction 4 de type Kruppel ou Kruppel-like factor 4 en anglais
$l$ :	longueur de la ligne de transmission
LDL :	lipoprotéines de basse densité ou Low Density Lipoprotein en anglais
LV :	impulsion électrique de bas voltage ou Low Voltage en anglais
LY :	Lucifer Yellow
mARN :	ARN messenger
MEM :	milieu essentiel minimum ou Minimal Essential Medium en anglais
MOSFET :	transistor à effet de champ à grille isolée ou Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor en anglais
MSC :	cellules souches mésenchymateuses humaines ou Mesenchymal Stem Cell en anglais
NFAT :	facteur nucléaire des cellules T actives ou Nuclear Factor of Activated T cells
Oct4 :	facteur de transcription de liant à l'octamère ou Octamer-binding transcription factor 4 en anglais
PA :	Acide Phosphatidique
PBS :	tampon phosphate salin ou phosphate buffered saline en anglais
PEG :	PolyEthylène Glycol
PL :	PhosphoLipides
PtdCho :	PhosphatidylCholine
PtdEtn :	PhosphatidylEthanolamine
PtdIns :	PhosphatidylInositol
PtdIns(4,5) $P_2$ :	PtdIns 4-5 bisphosphate
PtdSer :	PhosphatidylSérine
$P_x$ :	perméabilité de la membrane à la substance X

R :	constante des gaz parfaits
ROS :	Reactive Oxygen Species
r :	rayon de la cellule
RE :	réticulum endoplasmique
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
siARN :	petit ARN interférent
SM :	SphingoMyéline
S-MEM :	milieu essentiel minimum pour culture en suspension ou Suspension Minimal Essential Medium en anglais
SOCC :	Canaux sensibles au relâchement du calcium des stocks intracellulaires ou Store-Operated Calcium Channels en anglais
T :	base thymine
T <sub>a</sub> :	Température (en degrés Kelvin)
TK :	Thymidine Kinase
t-SNARE :	récepteurs cibles aux protéines d'attachement au facteur sensible au N-éthylmaleimide ou target Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor en anglais
V <sub>0</sub> :	tension initiale
VOCC :	canaux calciques voltage dépendants ou Voltage-Operated Calcium channel en anglais
v-SNARE :	récepteurs vésiculaires aux protéines d'attachement au facteur sensible au N-éthylmaleimide ou vesicular Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor en anglais
[X] :	concentration en X
Z :	impédance de la source de tension continue
Z <sub>C</sub> :	impédance de l'échantillon



## **Introduction bibliographique**

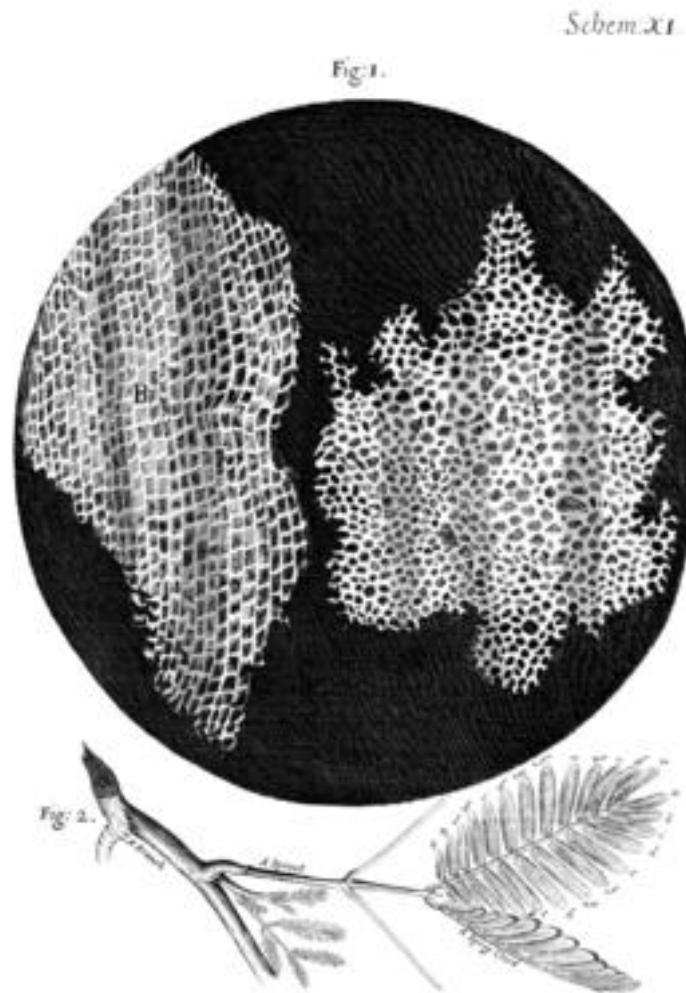


# I. Les membranes cellulaires

## A. La membrane plasmique

- 1) Une structure délimitant la cellule et retrouvée dans tous les organismes vivants

En 1665, l'anglais Robert Hooke est le premier scientifique à avoir défini la notion de cellule biologique, après avoir observé des cellules mortes dans des coupes de liège (provenant du chêne-liège) comme on peut le voir sur la Figure 1. Il pensait que seul le liège était composé de petites chambres <sup>1</sup> agencées comme les cellules d'un nid d'abeille, d'où le nom de cellules.



**Figure 1 : Cellules observées par R. Hooke dans du liège de chêne-liège<sup>1</sup>**

Il a fallu attendre presque deux siècles, en 1838 et 1839 pour que deux scientifiques allemands, Matthias Schleiden et Theodor Schwann, définissent la théorie cellulaire dont la

base est que « la cellule est l'unité fondamentale des êtres vivants » <sup>2, 3</sup>. Cette théorie a ensuite été développée par un médecin allemand, Rudolf Virchow qui a énoncé que « toute cellule provient d'une autre cellule » (1855) <sup>4</sup>. Les autres axiomes de la théorie cellulaire sont les suivants :

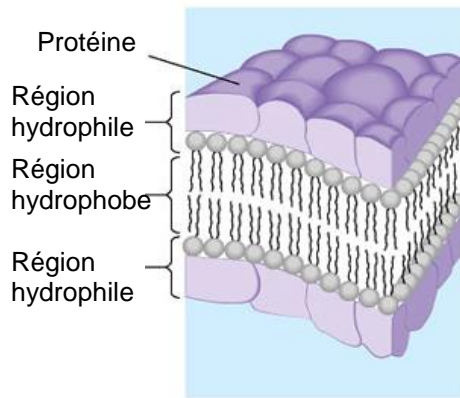
- la cellule est une unité vivante et l'unité de base du vivant,
- il y a individualité cellulaire grâce à la membrane plasmique qui règle les échanges entre la cellule et son environnement.
- la cellule renferme sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN) l'information nécessaire à son fonctionnement et à sa reproduction.

Depuis, il a été montré que la membrane plasmique est commune à tous les organismes vivants, qu'ils soient animaux, végétaux, unicellulaires ou pluricellulaires. Par contre, la composition de la membrane plasmique n'est pas commune à tous les organismes (cf. I.A. 2)). La membrane plasmique délimite la cellule mais cette délimitation n'est pas totalement étanche car toute cellule doit échanger des molécules avec son environnement (absorption sélective de nutriments, sécrétion de molécules dans l'environnement cellulaire) et c'est la membrane plasmique qui définit les règles de ces échanges entre la cellule et son environnement.

## 2) Structure et composition biochimique de la membrane plasmique

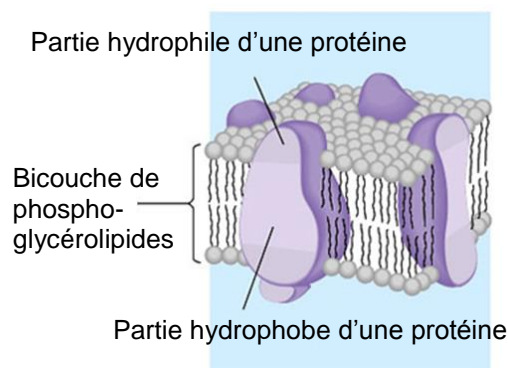
### a) Notions historiques

Les premiers travaux sur la composition des membranes plasmiques datent de la fin du dix-neuvième siècle et c'est Charles Ernest Overton, pendant la période 1895-1901, qui a émis le premier l'hypothèse de la nature lipidique de cette barrière après avoir observé que la capacité d'une substance à traverser la membrane plasmique dépend de son caractère hydrophobe <sup>5, 6</sup>. Il a fallu attendre 1925 et les travaux d'Evert Gorter et de François Grendel pour que la structuration de la membrane plasmique en bicouche lipidique soit évoquée. Les deux scientifiques ont travaillé sur des extraits de lipides d'érythrocytes humains et ont évalué l'aire que ces extraits lipidiques couvraient sur une surface d'eau. Ils ont observé que cette aire était deux fois supérieure à celle des érythrocytes. C'est ainsi qu'ils ont compris que la membrane plasmique était une bicouche lipidique <sup>7</sup>. Puis en 1935, James Frederic Danielli et Hugh Davson ont proposé un modèle moléculaire où la bicouche lipidique est bloquée entre deux couches de protéines membranaires <sup>8</sup> (Figure 2).



**Figure 2 : Modèle membranaire de Davson et Danielli <sup>9</sup>**

Ce modèle permettait d'expliquer que les membranes biologiques absorbent plus d'eau à leur surface que des membranes artificielles composées uniquement de phosphoglycérolipides. Ce modèle présentait quelques incohérences. Il était difficile d'envisager pour différents scientifiques que toutes les membranes sont uniformes et identiques alors qu'en microscopie électronique il y a des différences entre les membranes des organites et la membrane plasmique par exemple. Par ailleurs, les protéines membranaires sont beaucoup moins solubles dans l'eau que les protéines du cytosol. Elles possèdent des parties hydrophobes et des parties hydrophiles et le modèle de Davson et Danielli implique que leurs parties hydrophobes auraient été en contact avec des espaces hydrophiles. C'est en réponse à ces questionnements émergents que Jonathan Singer et Garth Nicolson ont proposé le modèle de la mosaïque fluide (Cf. I.A. 3)). Dans ce modèle, les parties hydrophiles des phospholipides sont en contact direct avec l'eau. Les protéines sont insérées totalement ou partiellement dans la membrane où elles peuvent se déplacer (Figure 3).



**Figure 3 : Modèle membranaire de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson <sup>9</sup>**

Ce modèle est le modèle généralement accepté et enseigné de nos jours.

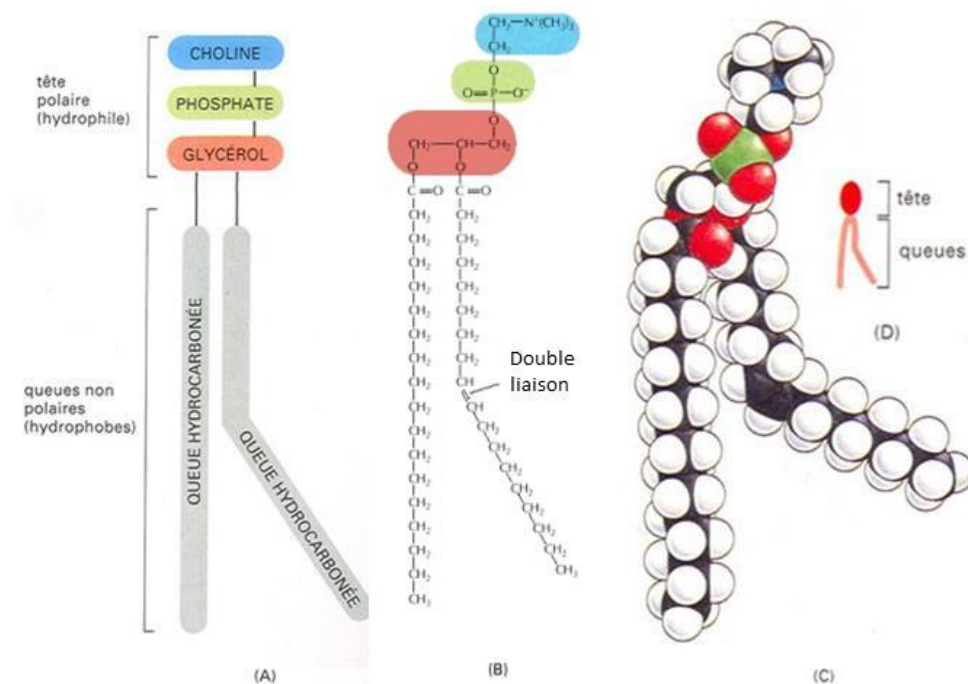


## b) Les lipides

Les membranes plasmiques sont généralement constituées d'environ 50% de lipides et d'environ 50% de protéines <sup>10</sup>. Les différents lipides représentés dans la membrane des eucaryotes sont les phospholipides (environ 60%) et le cholestérol (environ 40%) <sup>10</sup>. Ces proportions varient d'une espèce à une autre et d'un type cellulaire à un autre. Les phospholipides s'assemblent spontanément en bicouche lipidique dont l'épaisseur est comprise entre 3 à 5 nanomètres en fonction de la composition lipidique.

### i. Les phospholipides

Les phospholipides sont des lipides amphiphiles. La partie hydrophile est constituée d'une tête polaire contenant un groupement phosphate alors que la partie hydrophobe est composée de deux acides gras reliés entre eux soit par un glycérol (les phosphoglycérides) soit par une sphingosine (les sphingolipides) <sup>11</sup>. Les quatre phospholipides les plus représentés dans la membrane plasmique des mammifères sont la phosphatidylcholine (PtdCho) (Figure 4), la phosphatidylsérine (PtdSer), la phosphatidyléthanolamine (PtdEtn) et la sphingomyéline (SM) <sup>10</sup>. Les acides gras sont généralement composés de 14 à 24 atomes de carbone. L'une des chaînes hydrocarbonées possède en général une ou plusieurs insaturations alors que l'autre est insaturée (cas des phospholipides les plus représentés dans les membranes biologiques) <sup>12</sup>. Ces insaturations créent un angle dans la chaîne aliphatique et jouent un rôle important dans la fluidité des membranes.



**Figure 4 : Exemple de la phosphatidylcholine. (A) représentation schématique. (B) formule semi-développée. (C) modèle compact. (D) symbole. Source : Alberts (2004) <sup>12</sup>.**

La PtdSer a la particularité de posséder une tête chargée négativement.

La longueur de la chaîne carbonée est aussi un paramètre important pour la fluidité de la membrane. La structure amphiphile des phospholipides permet un auto assemblage spontané de ces lipides en bicouches de 3 à 5 nm (pour la plupart des biomembranes)<sup>13</sup> lorsqu'ils sont dans un milieu aqueux et que les parties hydrophiles de chaque feuillet sont en contact avec des milieux aqueux (par exemple le cytoplasme d'un côté et le milieu extracellulaire de l'autre). Il n'existe pas de liaison covalente entre les phospholipides et la structure de la bicouche lipidique est maintenue uniquement par des interactions faibles de type interactions hydrophobes. La géométrie moyenne des lipides des membranes biologiques en conditions physiologiques est souvent assimilée à une géométrie cylindrique de section d'environ 0,63 nm et de longueur moyenne 1 à 1,5 nm selon le type de chaîne carbonée<sup>14</sup>. En réalité, il existe différentes formes géométriques selon les différents types de phospholipides. En effet, les molécules de PtdEtn ont une forme conique, les molécules de lysophosphatidylcholine ont une forme de cône inversé et les molécules de PtdCho ont une forme cylindrique<sup>15</sup>

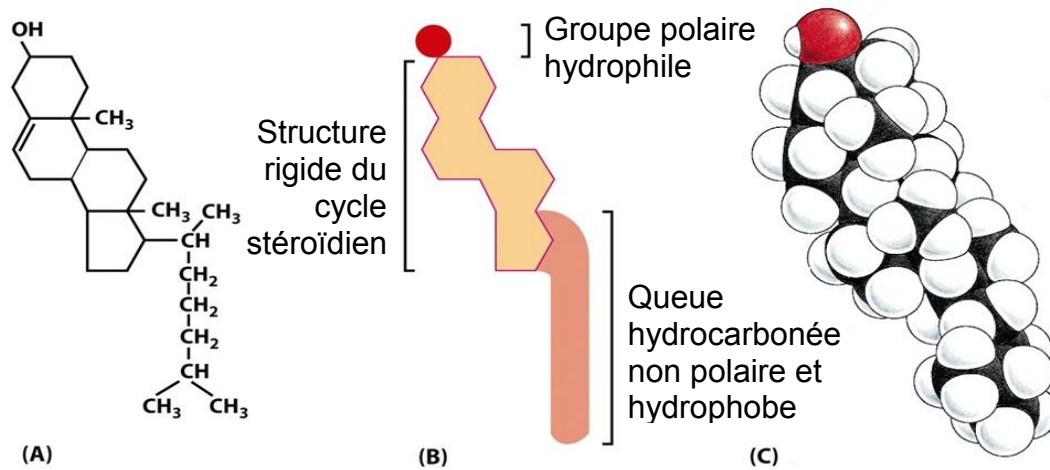
Les types de phospholipides présents dans les membranes plasmiques diffèrent d'une espèce à une autre. Chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) 80% des phospholipides membranaires sont des phosphatidyléthanolamines alors qu'il y en a 4 fois moins dans les érythrocytes de mammifère<sup>16</sup>.

## ii. Le cholestérol

Le cholestérol est retrouvé exclusivement dans le monde animal eucaryote (il n'y a pas de cholestérol chez les procaryotes<sup>12</sup>) et est le deuxième composant lipidique de la membrane plasmique de ces organismes. Le cholestérol présent dans le règne animal a pour analogue, en structure et en rôle, les phytostérols dans le règne végétal. D'une part, le cholestérol est composé d'un groupement hydroxyle qui correspond à la partie hydrophile du cholestérol et qui se positionne au niveau des têtes polaires des phospholipides dans la bicouche. D'autre part, il possède une partie hydrophobe composée d'une structure rigide, le cycle stéroïdien (quatre cycles jointifs), et d'une queue hydrocarbonée (Figure 5) qui est insérée au niveau des queues des phospholipides.

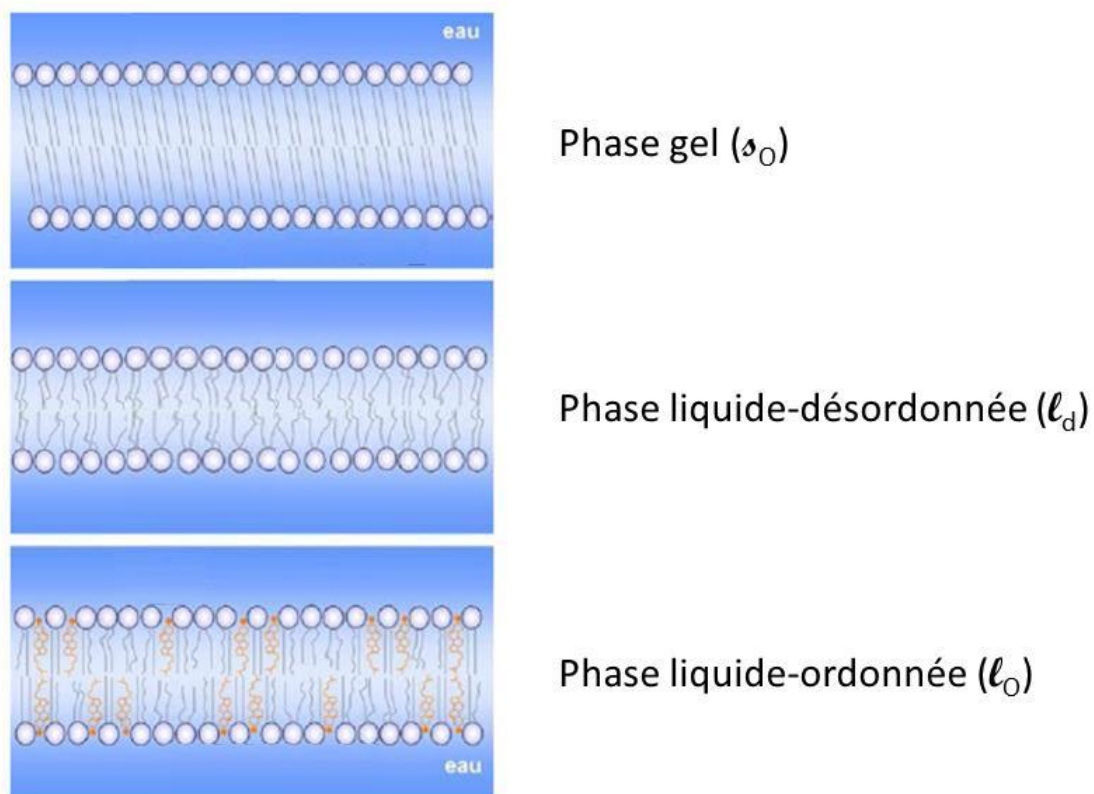
Le cholestérol est le précurseur de certaines hormones sexuelles telles que la progestérone et la testostérone mais aussi de la vitamine D.

On définit différents états de phase de la bicouche lipidique nommés  $s_o$  pour phase solide ordonnée ou gel où toutes les queues aliphatiques sont alignées,  $l_d$  pour phase liquide désordonnée où l'orientation des queues aliphatiques est aléatoire et  $l_o$  phase liquide ordonnée où l'orientation des queues aliphatiques est forcée par l'insertion de cholestérol par exemple.



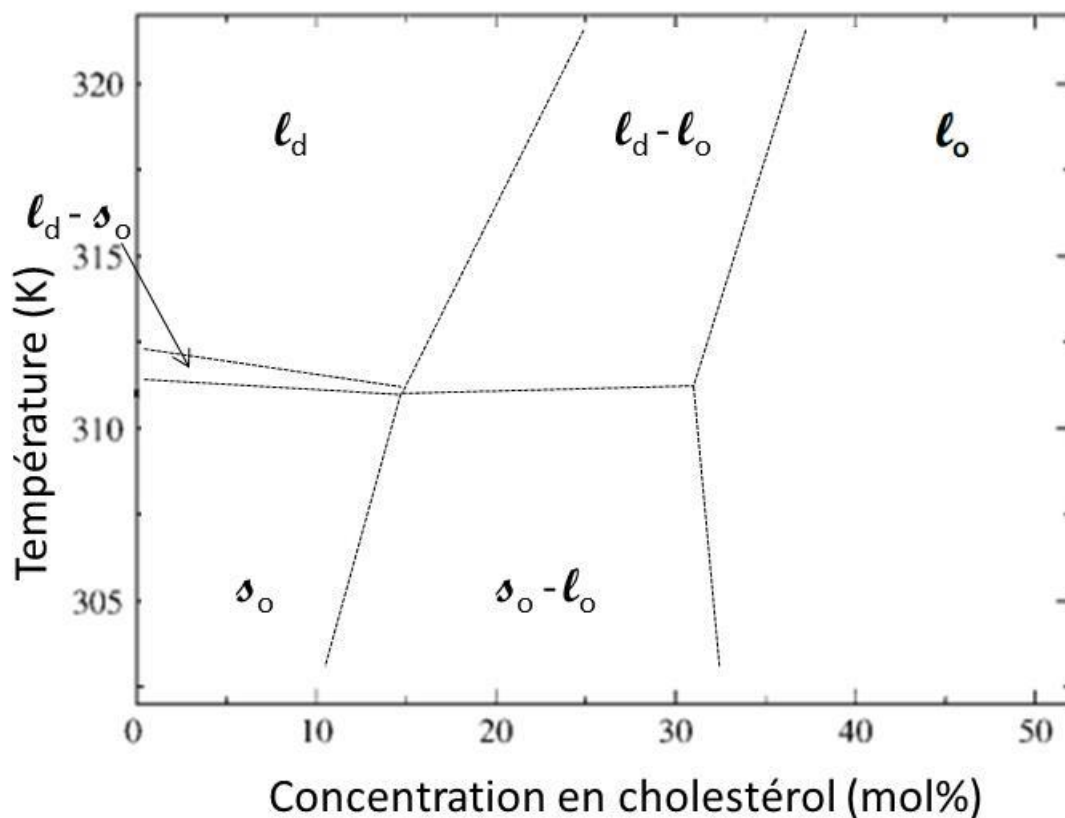
**Figure 5 : La molécule de cholestérol. (A) formule semi-développée. (B) représentation schématique. (C) modèle compact.** Source : Alberts (2004)<sup>12</sup>.

Ces différents états conditionnent la fluidité de la membrane car ils sont à relier avec l'organisation dans l'espace des queues hydrophobes et à leur liberté de mouvement (Figure 6).



**Figure 6 : Etats de phase des biomembranes.** L'organisation des queues hydrophobes des phospholipides est à l'origine de l'état de phase de la membrane. D'après le Guyader (2007)<sup>17</sup>.

La présence de cholestérol dans les membranes biologiques en change les propriétés physico-chimiques. Le cholestérol inséré dans les membranes modifie la fluidité membranaire en créant une région rigide au niveau de l'interaction entre les acides gras et le cycle stéroïdien <sup>12</sup>. Aux températures basses, le cholestérol abaisse le point de fusion de la membrane en limitant l'entassement des phosphoglycérolipides <sup>9</sup>. Prenons l'exemple de l'effet de la proportion de cholestérol sur la fluidité d'une membrane composée d'un seul type de phospholipides le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) qui est un modèle pour l'étude des membranes biologiques. L'état de phase de la bicouche lipidique dépend de la température et de la concentration en cholestérol. Il existe des zones  $l_d-l_o$ ,  $s_o-l_o$  et  $l_d-s_o$  qui correspondent respectivement à des mélanges de phases liquide désordonnée et liquide ordonnée, solide ordonnée et liquide ordonnée et pour finir liquide désordonnée et solide ordonnée.



**Figure 7 : Diagramme de phase du DPPC en fonction de la quantité de cholestérol et de la température.** Courbes déterminées par calorimétrie différentielle à balayage et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)  $^2H$ . Source : Vist et Davis (1990) <sup>18</sup>.

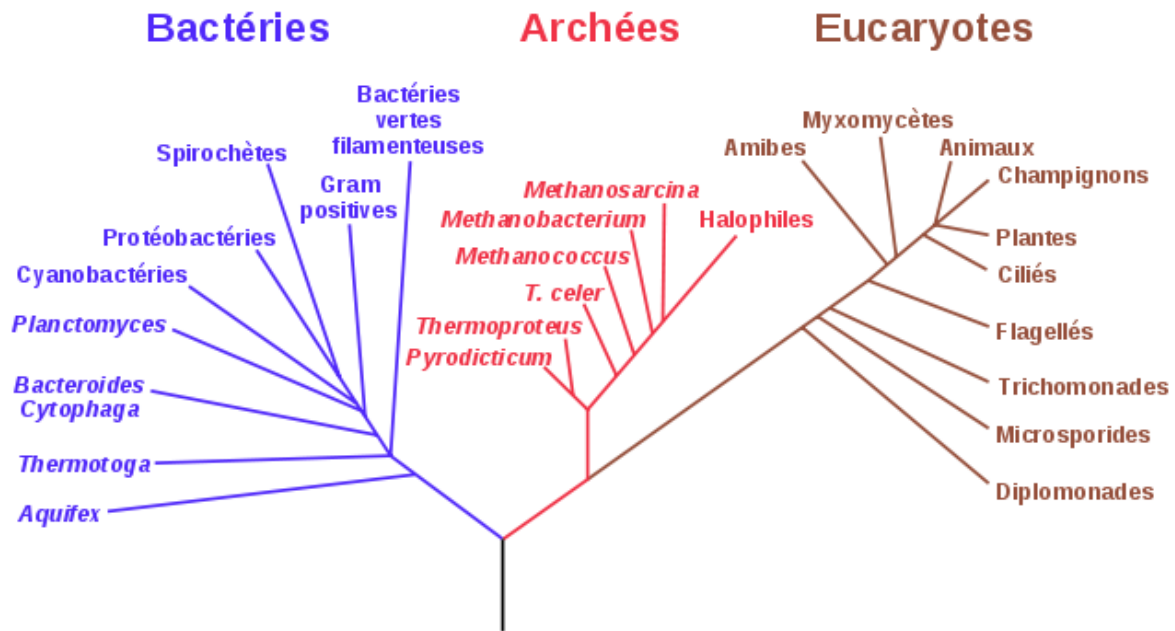
D'après le diagramme de la Figure 7, si la membrane est à une température légèrement supérieure à la température de fusion des lipides on voit que l'augmentation de la concentration en cholestérol fait passer de la phase  $l_d$  à un mélange  $l_d-l_o$  entre cette phase et

la phase  $\ell_o$ . C'est-à-dire que le cholestérol ordonne le système et modifie la rigidité de l'ensemble en fonction de la proportion de cholestérol et de la température. Par exemple, la température de fusion du DPPC pur est proche de 313°K et elle est modifiée par l'ajout de cholestérol. En effet, pour une concentration de cholestérol de 30% il n'y a pas de solidification de la bicouche si on abaisse la température jusqu'à 302°K ce qui montre bien que l'augmentation de la concentration de cholestérol permet de conserver une fluidité de la membrane à une température plus basse que celle de fusion des phospholipides.

L'augmentation de la proportion de cholestérol dans les membranes est un système naturel de défense contre le froid de certains animaux comme par exemple les crustacés qui vivent dans le courant froid du Labrador, au large du Québec et qui concentrent le cholestérol dans leurs membranes pour en assurer la fluidité <sup>9</sup>.

### *iii. Le cas particulier des archées*

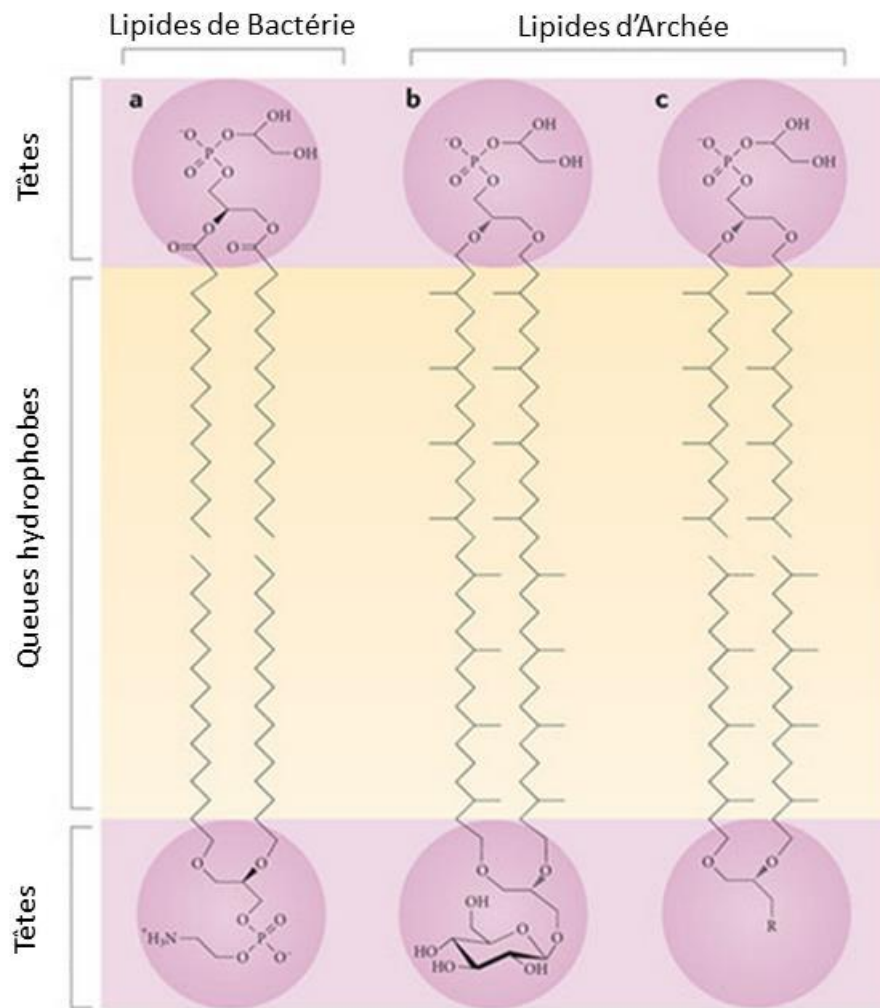
Les archéobactéries ou archées ont été définies comme l'un des trois règnes du monde vivant au même titre que les Bactéries et les Eucaryotes par Carl Woese en 1977 (Figure 8) <sup>19</sup>. Ce sont des organismes unicellulaires procaryotes qui ont été longtemps intégrés dans le règne des bactéries. A cause des localisations extrêmes dans lesquelles elles ont été trouvées (lacs salés, sources chaudes volcaniques, ...) et dans lesquelles la majorité des êtres vivants ne peuvent pas survivre, elles ont été appelées bactéries extrêmophiles. Cependant, les études phylogénétiques faites dans les années 1970-1980 sur les acides ribonucléiques (ARN) ribosomiques ont montré que les archées étaient biochimiquement plus proches des eucaryotes que des bactéries. La structure et le métabolisme des archées sont néanmoins proches de la structure et du métabolisme des bactéries car ce sont des procaryotes capables de différents métabolismes comme la méthanogénèse, par exemple. Cependant, certaines structures comme les protéines impliquées dans la réplication, la traduction ou la réparation de l'ADN sont semblables à celles retrouvées chez les eucaryotes.



**Figure 8 : Arbre phylogénétique de la vie.** (Source : <http://www.exobiologie.fr/index.php/actualites/publications-scientifiques/origine-et-evolution-des-microorganismes/>)

Les archées ont aussi la particularité de posséder des lipides membranaires très différents de ceux des bactéries et des eucaryotes puisqu'ils ne possèdent pas d'acides gras reliés au glycérol ou à la sphingosine par des liaisons ester mais des longues chaînes d'alcool isopréniques attachées au glycérol par des liaisons éther (Figure 9).

Les lipides des archées ont la particularité de posséder des ramifications au niveau des queues carbonées. De plus, ces lipides peuvent être retrouvés sous forme d'une bicouche lipidique ou d'une monocouche lipidique selon les organismes. Par ailleurs, les liaisons éther de ces lipides sont plus stables que les liaisons ester des bactéries et des eucaryotes. Ces propriétés permettent à ces organismes de survivre aux conditions extrêmes de température et de salinité dans lesquelles on peut les retrouver.



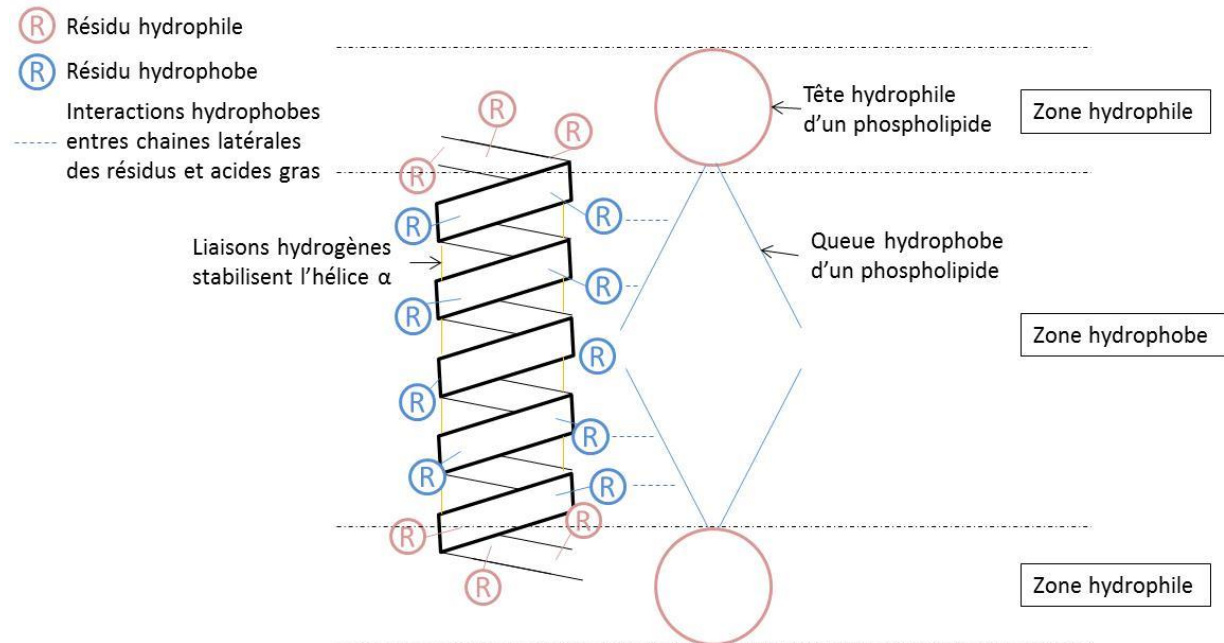
**Figure 9 : Comparaison des lipides de la membrane de Bactéries avec ceux de la membrane d'archées.** a : la membrane de bactérie représentée est composée d'un phosphatidylglycérol (en haut) et d'une phosphatidyléthanolamine (en bas). b et c représentent des lipides d'archées. b : lipide tétraéther formant une membrane monocouche retrouvée chez *Thermoplasma acidophilum* dont la partie hydrophobe est composée d'un caldarchéol C<sub>40</sub>C<sub>40</sub>. c : lipides composant une bicouche lipidique d'archées. La partie hydrophobe est composée d'un lipide diéther (isoprénoïdes d'Archées C<sub>20</sub>C<sub>20</sub>) qui peut être retrouvé chez les Halobactéries (bactéries vivant dans les milieux salés). Source : Albers et Meyer (2011) <sup>20</sup>.

### c) Les protéines

Les protéines représentent à peu près 50% du poids sec des membranes plasmiques. Les protéines possèdent une structure primaire (la séquence d'acides aminés), une structure secondaire (les structures de repliement dans l'espace de domaines de type hélice  $\alpha$ , par exemple), une structure tertiaire (l'association des différentes structures secondaires d'une chaîne polypeptidique) et dans certains cas une structure quaternaire (la structure tridimensionnelle composée par différentes sous-unités d'une même protéine). Les hélices  $\alpha$  résultent des interactions entre les résidus des différents acides aminés (liaisons ioniques,



hydrophobes, hydrogènes, ...). Lorsque les résidus externes de ces hélices  $\alpha$  sont hydrophobes, il est possible que ce domaine s'insère dans la bicouche lipidique et interagisse avec les parties hydrophobes des phospholipides (Figure 10). Lorsque plusieurs hélices  $\alpha$  sont disposées les unes à côté des autres, l'espace entre ces hélices peut définir un canal hydrophobe ou hydrophile selon les résidus présents entre ces hélices et ce canal peut être impliqué dans les échanges à travers les membranes.



**Figure 10 : Schéma d'une hélice  $\alpha$  protéique transmembranaire**

Un tour complet d'hélice  $\alpha$  a été mesuré entre 5,03 et 5,44 Å par Pauling *et al.* en 1951<sup>21</sup>. Certaines protéines membranaires ne traversent pas totalement la bicouche mais possèdent une interaction partielle avec l'un des feuillet de la membrane. Enfin, les protéines membranaires peuvent être isolées ou organisées en complexes protéiques.

#### d) Asymétries de la membrane plasmique

Il existe des différences entre les compositions lipidiques et protéiques des deux feuillet de la membrane plasmique. Cela génère une asymétrie dont l'origine est à relier aux mécanismes de synthèse de cette membrane.

Dans l'appareil de Golgi, certaines protéines membranaires peuvent être glycosylées. L'espace intérieur de l'appareil de Golgi possède des conditions chimiques réductrices, ce qui est nécessaire à cet ajout d'un groupement glucidique sur ces molécules membranaires. Lorsque ces molécules sont exportées jusqu'à la membrane plasmique par la libération de vésicules, ces groupements glucidiques sont retrouvés exclusivement sur le feuillet externe de la membrane, ce qui génère une asymétrie<sup>9</sup>. De plus, la répartition des phospholipides



dans les deux feuillets de la membrane n'est pas homogène. Les différents phospholipides composant la membrane sont généralement retrouvés dans les deux feuillets membranaires. Cependant, certains phospholipides comme la sphingomyéline sont présents préférentiellement sur la face externe de la membrane plasmique car ce phospholipide est synthétisé dans la lumière de l'appareil de Golgi (comme le manteau glucidique). La PtdSer et le phosphatidylinositol (PtdIn), à l'inverse, sont retrouvés majoritairement dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Cette asymétrie est nécessaire dans certains mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation cellulaire, par exemple. En effet, les PtdIn font face à l'intérieur du cytoplasme et peuvent ainsi être clivés par la phospholipase C, présente dans le cytoplasme, ce qui produit des phosphoinositols solubles dans le cytoplasme et des diacylglycérols solubles dans la membrane. Ces molécules sont impliquées dans la mise en place du message secondaire après réception d'un signal par une protéine membranaire comme par exemple dans le cas des récepteurs couplés à des protéines G (Cf. I. A. 4) b) i) <sup>13</sup>.

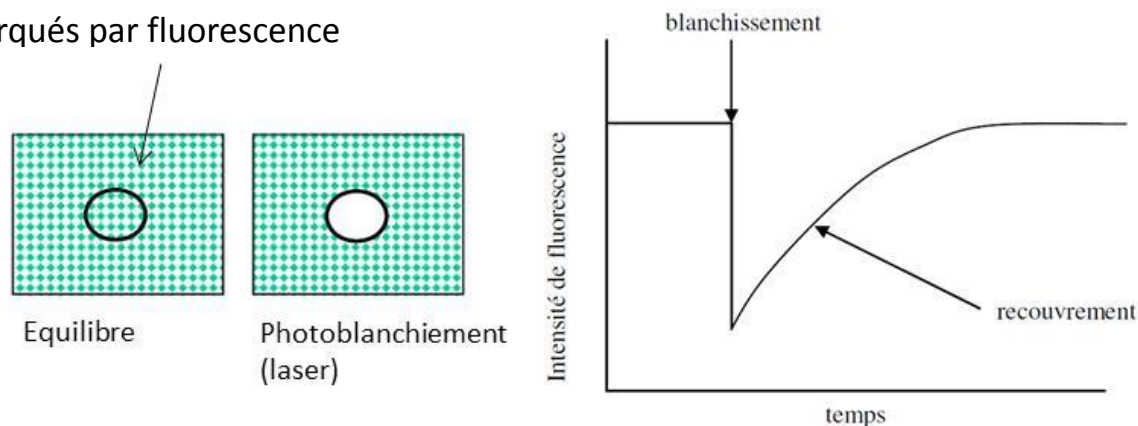
### 3) Une mosaïque fluide

Ces protéines membranaires et ces lipides s'assemblent selon le modèle de Singer et Nicolson qui est aussi appelé modèle de la mosaïque fluide. En effet, les lipides et les protéines ont la possibilité de se déplacer au sein de cette structure. Les phospholipides peuvent réaliser plusieurs mouvements :

- ils peuvent tourner sur eux même autour de l'axe passant par la tête hydrophile et la queue hydrophobe,
- ils peuvent diffuser dans la membrane parallèlement au plan de la membrane avec un coefficient de diffusion de  $10^{-12}$  m<sup>2</sup>/s dans la membrane plasmique et de  $10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s dans une bicouche purement lipidique <sup>13</sup>,
- ils peuvent passer d'un feuillet à l'autre en réalisant un flip flop grâce à des enzymes (les flippases). Pour un phospholipide donné, le phénomène de flip-flop ne se produit en moyenne qu'une fois en plusieurs heures <sup>9</sup>.

La diffusion latérale des lipides a été montrée avec la méthode du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Dans cette expérience, des lipides ont été marqués avec des molécules fluorescentes. La fluorescence est localement détruite par génération d'un photoblanchiment à l'aide d'une impulsion laser puissante puis l'intensité de la fluorescence est suivie au niveau de cette zone altérée. En quelques minutes, l'intensité de fluorescence remonte pour atteindre la valeur des zones non altérées car les phospholipides qui n'ont pas été exposés au laser et qui sont encore fluorescents se déplacent de la zone non traitée à la zone traitée ce qui démontre la mobilité latérale des phospholipides dans la membrane plasmique <sup>13</sup> (Figure 11).

Lipides membranaires  
marqués par fluorescence



**Figure 11 : Expérience de FRAP montrant la fluidité des lipides dans la membrane plasmique**

La fluidité d'une membrane dépend de sa composition et de sa température. Si l'on fabrique artificiellement des bicouches lipidiques composées d'un seul type de phospholipide on peut déterminer sa température de congélation qui correspond au passage du mélange en phase  $s_o$ . Plus les phospholipides présentent des queues carbonées courtes et plus il y a d'insaturations, plus cette température de congélation est basse <sup>12</sup>. On voit sur le Tableau 1 que pour la même longueur d'acide gras l'ajout d'une insaturation fait passer la température de fusion de 70°C à 13°C.

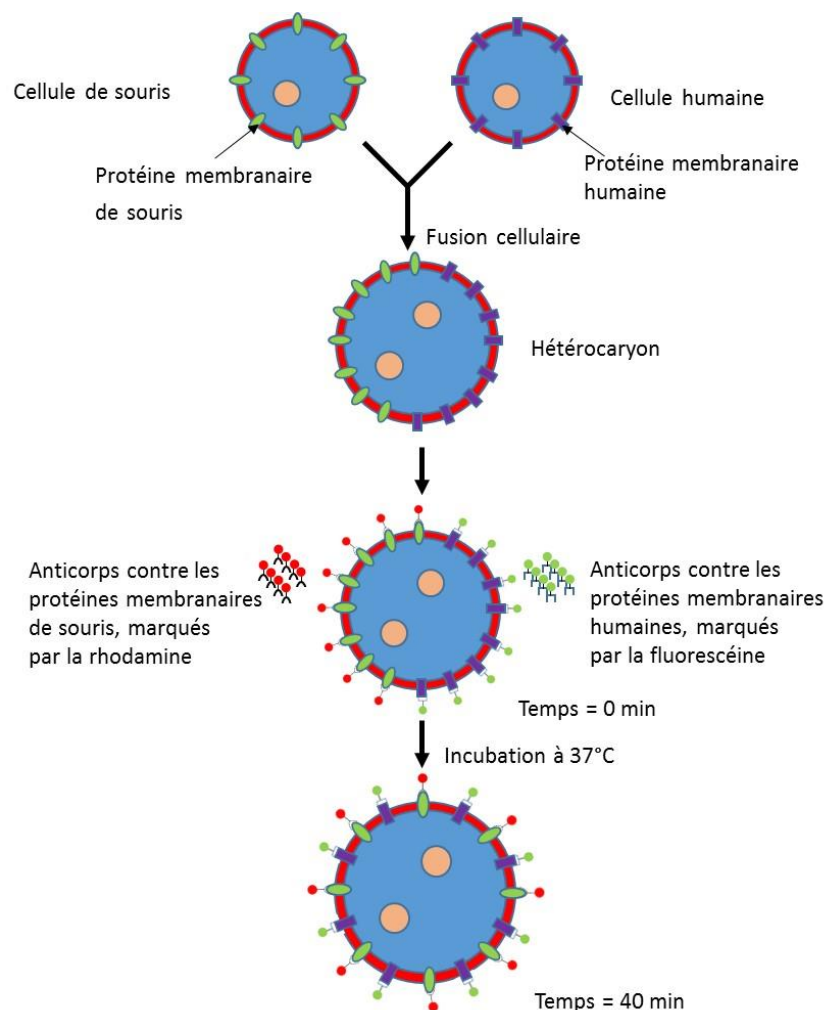
**Tableau 1 : Points de fusion d'acides gras communs à 18 carbones.** D'après Karp et al.(2010) <sup>22</sup>

Acide Gras	Doubles liaisons	Température de fusion (°C)
Acide stéarique	0	70
Acide oléique	1	13
Acide linoléique	2	-9
Acide linoléique	3	-17

Les organismes tels que les bactéries et les levures dont la température dépend de la température de leur environnement ajustent la composition de leur membrane pour maintenir une fluidité constante. La réponse principale à une baisse de la température est de synthétiser plus de lipides avec des insaturations.

Les protéines, comme les lipides, peuvent tourner sur elles-mêmes et diffuser dans la membrane. Le phénomène de flip-flop n'a pas été observé pour les protéines membranaires à cause de leur taille et des interactions avec les autres molécules de la membrane<sup>11</sup>.

La fluidité protéique a été montrée par Frye et Edidin en 1970 en utilisant des marquages avec des anticorps fluorescents reconnaissant des protéines membranaires. Deux cellules marquées avec des anticorps couplés à des fluorophores de différentes couleurs sont fusionnées grâce au virus de Sendai. On observe une répartition localisée des molécules fluorescentes (les molécules rouges au niveau d'un hémisphère cellulaire et les vertes au niveau de l'autre hémisphère). Quarante minutes après, on visualise une homogénéisation des deux marqueurs prouvant que les protéines ont bien diffusé dans la membrane<sup>23</sup> (Figure 12).



**Figure 12 : Expérience démontrant la fluidité membranaire au niveau des protéines dans des cellules hybrides homme - souris**

Les protéines sont plus grosses que les phospholipides et elles se déplacent globalement plus lentement dans la membrane mais la vitesse de diffusion des protéines membranaires

dans la bicouche lipidique varie beaucoup d'une protéine à une autre. Certaines se déplacent aussi vite que les lipides alors que d'autres sont quasiment immobiles<sup>11</sup>.

#### 4) Rôles de la membrane plasmique

##### a) Les rôles tenus par les lipides

###### *i. Un rôle de barrière*

Si on leur laisse suffisamment de temps, quasiment toutes les molécules peuvent traverser la bicouche lipidique dans le sens de leur gradient de concentration. Cependant, la vitesse de diffusion varie fortement en fonction de la molécule qui doit traverser la membrane car la partie lipidique des biomembranes agit comme un filtre sélectif. Les gaz tels que l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> traversent lentement mais librement la bicouche lipidique ainsi que les molécules hydrophobes non polaires comme les hormones lipidiques du type des hormones stéroïdiennes sexuelles. Le cas de l'eau est particulier car c'est une molécule polaire mais grâce à sa très petite taille elle peut traverser la bicouche<sup>9</sup> mais en très petite quantité. A l'échelle de temps de la vie cellulaire, les ions et les molécules polaires autres que l'eau ne diffusent quasiment pas à travers les phospholipides. Le transport de ces molécules, qui peuvent être essentielles à la cellule, est assuré par les protéines membranaires.

Par ailleurs, l'assemblage spontané des lipides de la membrane permet à la bicouche d'agir comme une barrière mécanique pour protéger les cellules. En cas de petits dommages sur la membrane, les interactions hydrophobes donnent des propriétés d'auto-cicatrisation car les bords libres de la plaie membranaire sont en contact avec l'eau, ce qui est défavorisé sur le plan de l'énergie physico-chimique et les lipides se réassemblent spontanément pour aller contre ce phénomène. Ce mécanisme a été visualisé par microscopie sur des vésicules lipidiques<sup>24</sup>.

###### *ii. Un rôle structural*

La membrane plasmique définit les limites spatiales de la cellule ainsi que son intégrité. Le principal rôle de la membrane plasmique est de définir le compartiment cellulaire. La bicouche lipidique est capable de conserver son architecture même lorsque les paramètres du milieu extérieur changent considérablement (force ionique, pH). De plus, la fluidité membranaire est majoritairement assurée par l'état physique des lipides membranaires et est à relier avec de nombreux phénomènes biologiques tels que les mouvements, la croissance et la division des cellules ainsi qu'avec l'endocytose et l'exocytose.

Les cellules ont des formes liées à leur fonction cellulaire et cela peut se traduire par des différences au niveau de la membrane. Par exemple, les érythrocytes ont une membrane

souple et lisse qui leur permet de passer dans les capillaires alors que certaines cellules comme les cellules de Schwann (qui entourent les neurones) produisent plusieurs couches d'une membrane modifiée appelée gaine de myéline qui joue un rôle primordial dans la conduction du signal nerveux<sup>13</sup>.

## b) Les rôles tenus par les protéines

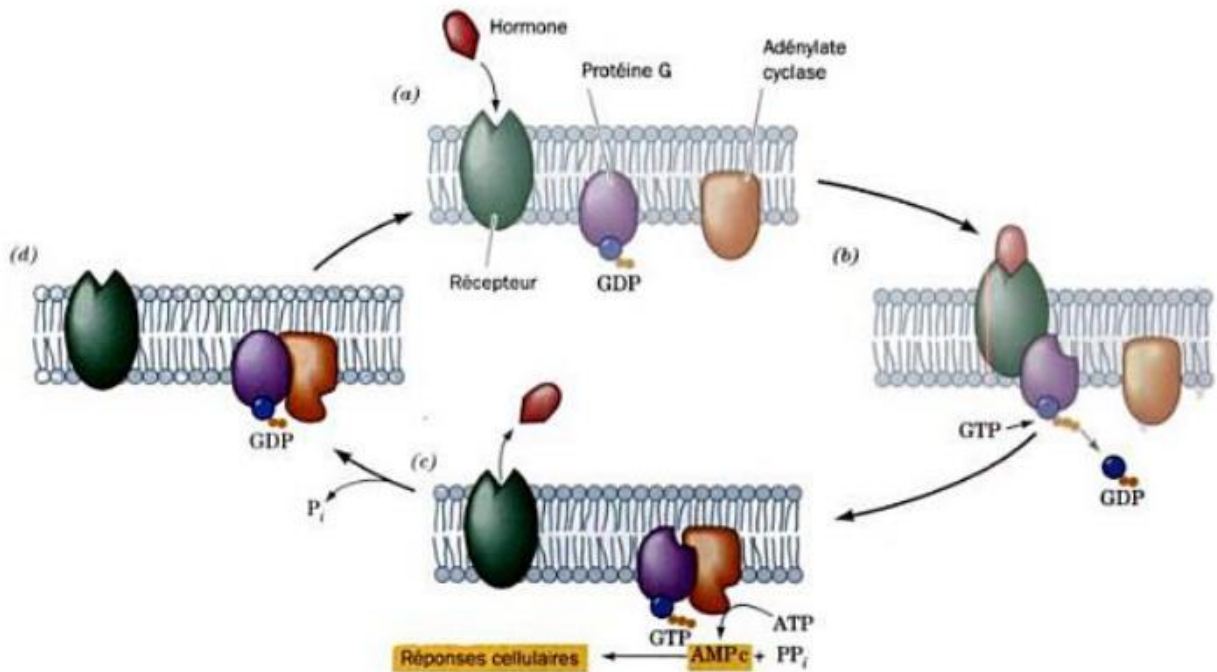
### *i. Un rôle de capteur et de transmetteur de signaux*

Les signaux intercellulaires que les cellules peuvent capter peuvent être de natures variées. Si on ne s'intéresse qu'aux hormones, elles peuvent être de deux natures : lipidiques ou protéiques. Les hormones lipidiques peuvent traverser la bicouche lipidique et atteindre directement leurs cibles intracellulaires alors que les hormones protéiques qui sont des molécules hydrophiles et chargées ne peuvent pas entrer dans la cellule. Les protéines sont captées par des récepteurs membranaires spécifiques qui reconnaissent la forme et certains groupements de résidus de la protéine et se fixent par complémentarité à ces hormones qui se comportent comme des ligands. La fixation d'un ligand sur le récepteur va entraîner un changement de la conformation du récepteur protéique qui conduira à différents types de réponses. Il existe trois grands types de récepteurs protéiques membranaires :

- les récepteurs couplés à une protéine G,
- les récepteurs couplés à un canal ionique,
- les récepteurs couplés à une tyrosine kinase<sup>25</sup>.

Les récepteurs couplés à une protéine G représentent une grande famille de protéines homologues possédant 7 domaines intramembranaires<sup>26</sup> qui diffèrent par leur site de fixation du ligand et leur capacité à recruter différentes protéines G internes<sup>25</sup>. Ces récepteurs sont impliqués, entre autres, dans la signalisation de l'adrénaline. Le fonctionnement de ces récepteurs est détaillé dans la Figure 13. Lorsqu'il y a fixation du ligand spécifique à un récepteur donné, il y a une modification de la conformation de la protéine qui entraîne l'activation des protéines G hétérotrimériques composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . A l'état inactivé, la protéine G fixe un Guanosine Di-Phosphate (GDP). La création du complexe hormone-récepteur entraîne l'ouverture du site de fixation du nucléotide et il y a relargage du GDP et fixation du Guanosine Tri-Phosphate (GTP). Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  du trimère se dissocient de la sous-unité  $\alpha$  qui était fixée au récepteur à 7 domaines transmembranaires, ce qui abaisse l'affinité de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G pour ce récepteur. Il y a séparation des deux molécules. La libération de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G augmente son affinité pour une autre protéine transmembranaire qui est en général une enzyme, ce qui active cette enzyme. Un exemple d'enzyme qui peut être activée par la protéine G est

l'Adénylate Cyclase (AC) qui convertit l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) en Adénosine Mono-Phosphate cyclique (AMPc) qui est un second messenger capable d'activer la protéine kinase A qui peut phosphoryler de nombreuses enzymes cytoplasmiques et en moduler l'action (Figure 13). La protéine G a une activité GTPasique qui lui permet d'hydrolyser le GTP ce qui inactive la protéine G, qui retourne à son état initial.

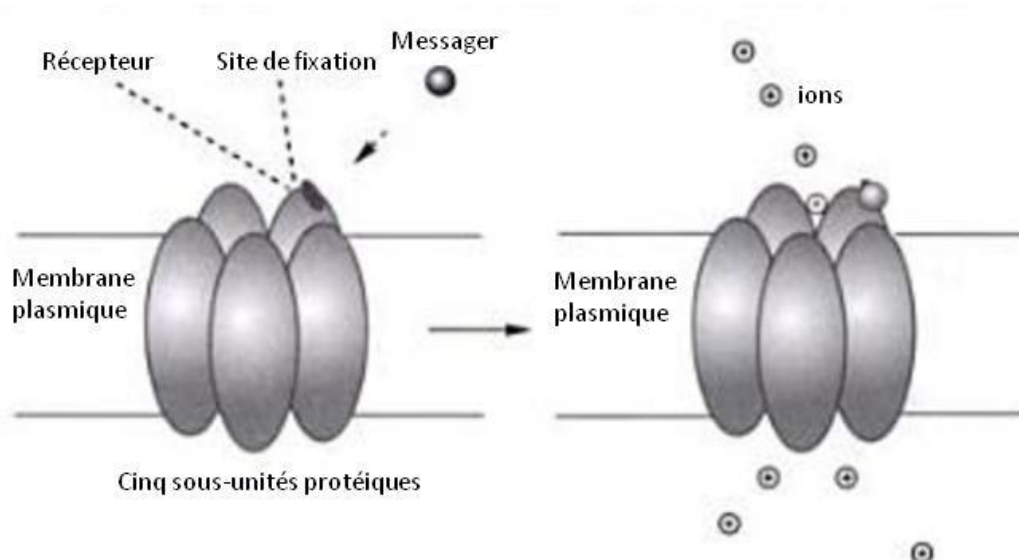


**Figure 13 : Récepteur couplé à une protéine G et cycle d'activation/désactivation de l'adénylate cyclase (AC) stimulée par une hormone.** (a) En l'absence d'hormone, une protéine G hétérodimérique fixe le GDP et l'AC est catalytiquement inactive. (b) Le complexe hormone-récepteur entraîne l'échange du GDP par du GTP sur la protéine G. (c) Le complexe protéine G + GTP se lie alors à l'AC et l'active à produire l'AMPc. (d) L'hydrolyse ultérieure, catalysée par la protéine G, du GTP qui lui est fixé, en GDP, entraîne la dissociation de la protéine G de l'AC qui est ainsi désactivée. Source : Voet (2005) <sup>26</sup>.

Les protéines G sont très répandues et ont des rôles très variés <sup>25</sup>.

Les récepteurs couplés à un canal ionique sont des récepteurs protéiques spécifiques qui possèdent plusieurs domaines transmembranaires qui définissent un canal hydrophile et un domaine extracellulaire qui capte le ligand. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne un changement de conformation de la protéine et ouvre le canal protéique permettant ainsi l'entrée d'ions spécifiques dans la cellule, ce qui modifie temporairement la perméabilité membranaire à ces ions (Figure 14).

Ce type de protéines est, entre autres, impliqué dans la signalisation synaptique entre des cellules électriquement excitables où les ligands sont des neurotransmetteurs <sup>27</sup>.

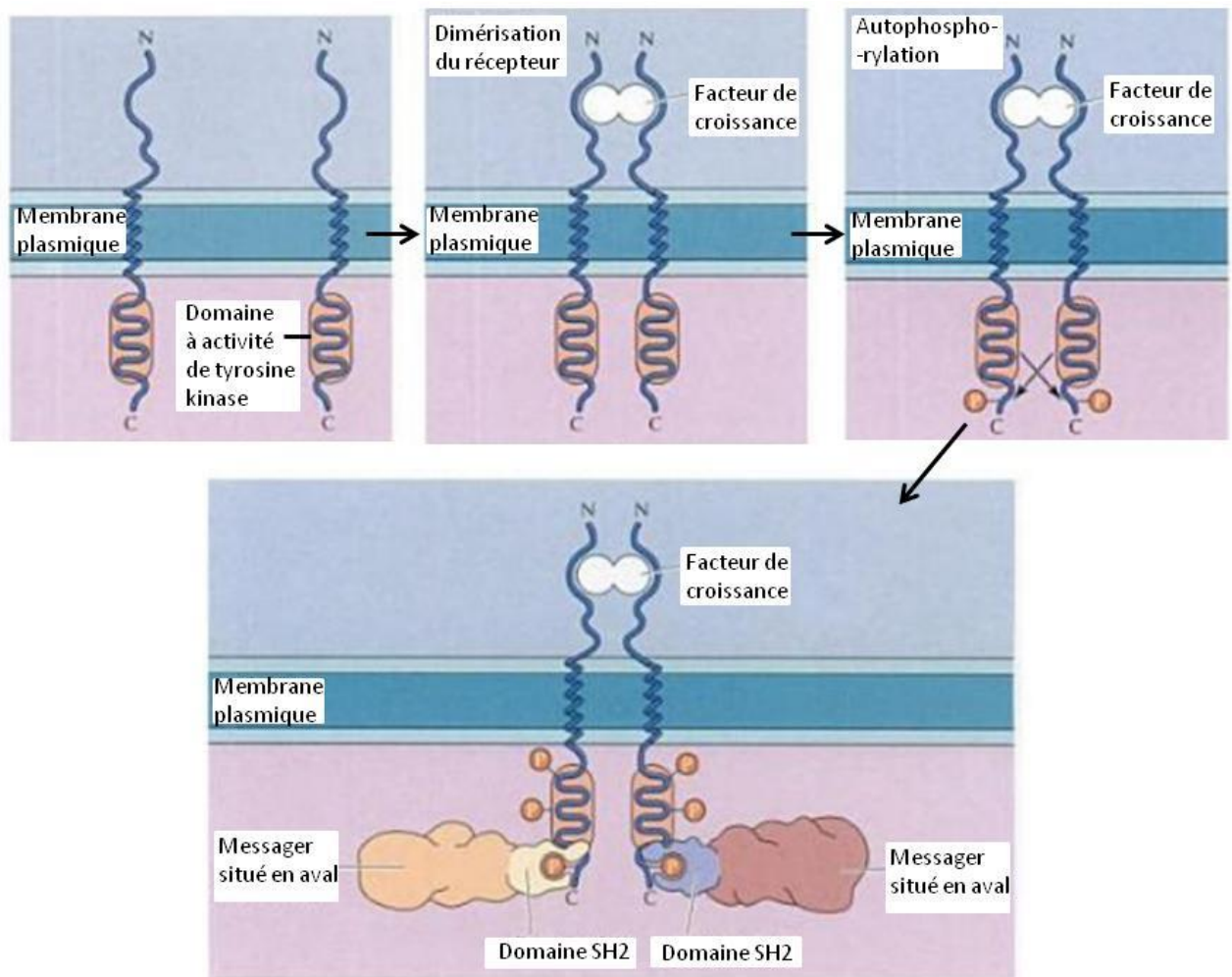


**Figure 14 : Récepteur couplé à un canal ionique.** La fixation du ligand entraîne l'ouverture du canal ionique. Source : Patrick (2002) [23](#).

La troisième grande famille de récepteurs membranaires est la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Ce sont des protéines transmembranaires qui possèdent un site extracellulaire de reconnaissance du ligand, une hélice  $\alpha$  transmembranaire et une partie intracellulaire avec plusieurs résidus tyrosines. La fixation d'un ligand sur le site de reconnaissance de la protéine entraîne une dimérisation de deux récepteurs à tyrosine kinase ce qui génère une protéine homodimérique. Chaque chaîne polypeptidique catalyse la phosphorylation des tyrosines de l'autre chaîne ce qui entraîne l'activation de ces deux sous-unités qui peuvent ainsi phosphoryler des protéines du cytoplasme (Figure 15). Ces protéines phosphorylées mobiles pourront ensuite s'engager dans différents types de voies cellulaires de signalisation<sup>25</sup>.

On remarquera que la fluidité membranaire est essentielle dans ce mécanisme pour qu'il puisse y avoir une mobilité des protéines membranaires et une dimérisation des récepteurs à activité tyrosine kinase.





**Figure 15 : Dimérisation et autophosphorylation d'un récepteur à activité tyrosine kinase dont le ligand est un facteur de croissance.** La capture du ligand induit la dimérisation du récepteur, suivie de son autophosphorylation (chaque chaîne polypeptidique catalyse la phosphorylation de sa voisine). D'après Cooper (1999)<sup>28</sup>.

### *ii. Un rôle structural*

Chez les organismes pluricellulaires, les cellules d'un même tissu adhèrent les unes aux autres, ce qui assure l'intégrité des tissus. Chez les végétaux, cette adhérence se fait par l'intermédiaire de la paroi et de la lamelle moyenne alors que, chez les animaux, l'adhérence des cellules les unes aux autres ou l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire est assurée par des jonctions intercellulaires qui impliquent des protéines membranaires et des éléments du cytosquelette de la cellule. Il existe trois grands types de jonctions intercellulaires chez les animaux :

- les jonctions étanches,
- les jonctions d'ancrage,
- les jonctions communicantes ou jonctions gap.



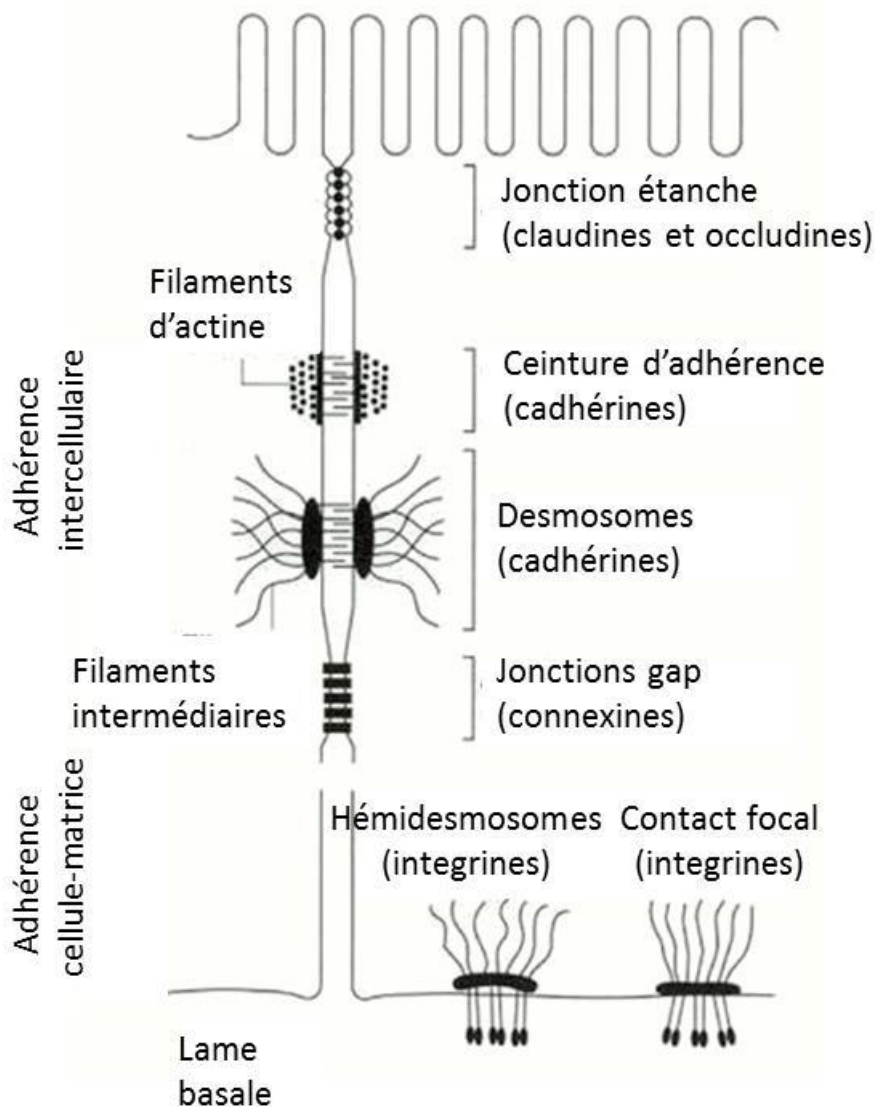
On retrouve ces structures de renforcement des tissus surtout dans les épithéliums et les parenchymes. La Figure 16 présente les jonctions présentes dans l'épithélium intestinal. La géométrie de ces jonctions intercellulaires est étroitement liée à leur fonction.

Les jonctions d'ancrage comportent les desmosomes, les hémidesmosomes et la ceinture d'adhérence. Les desmosomes et les hémidesmosomes ont des rôles de rivets cellulaires qui respectivement retiennent solidement les cellules entre elles et permettent l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire. Ces deux structures impliquent la liaison entre des éléments du cytosquelette, les filaments intermédiaires, et des plaques protéiques constituées de cadhérines (pour les desmosomes) et d'intégrines (pour les hémidesmosomes). Ces deux types de protéines sont des protéines transmembranaires constituées de trois parties fonctionnelles : une zone intracellulaire, une partie constituée d'hélices  $\alpha$  qui traversent la membrane et une partie extracellulaire. La partie intracellulaire de ces protéines possède des sites de reconnaissance et de liaison spécifique des filaments intermédiaires. Leur partie extracellulaire comporte respectivement un site de reconnaissance de la cadhérine (pour les desmosomes) ce qui permet l'ancrage de deux cellules voisines entre elles et un site de fixation à des protéines de la matrice extracellulaire (pour les intégrines). Ces jonctions forment des tissus résistants à l'étirement et à la compression.

La ceinture d'adhérence est un type de jonction cellulaire retrouvé tout autour de la cellule et qui met en contact des cadhérines transmembranaires avec un autre type de fibres du cytosquelette : les filaments d'actine, contrairement aux autres jonctions d'ancrage. Ce type de jonction cellulaire participe à la cohésion des cellules dans un tissu.

Les jonctions étanches sont des zones où les deux membranes voisines sont rapprochées et maintenues ensemble par des associations de protéines membranaires : les claudines et les occludines qui se font face. Ces jonctions servent de joint afin d'éviter le passage de matériel entre les cellules, ce qui est primordial dans l'épithélium intestinal qui est à l'interface entre le milieu intérieur et le milieu extérieur.

Le dernier type de jonction intercellulaire chez les animaux correspond aux jonctions communicantes ou jonctions gap. Elles consistent en des canaux hydrophiles reliant deux cellules voisines et permettant une continuité des cytoplasmes des cellules d'un tissu. Ce canal de 20 Å de diamètre <sup>11</sup> est formé par des connexons composés de 12 molécules de connexine qui possèdent chacune quatre hélices  $\alpha$  transmembranaires. La plupart des ions inorganiques et des métabolites (par exemple les sucres, les acides aminés et les nucléotides) peuvent circuler librement à travers ces jonctions alors que les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides sont trop volumineux pour traverser ces canaux <sup>11</sup>. Dans le tissu cardiaque, la circulation des ions à travers les jonctions gap permet la synchronisation des contractions <sup>29</sup>.



**Figure 16 : Les jonctions intercellulaires au niveau de cellules épithéliales intestinales**  
 (source : [http://www.dematice.org/ressources/PCEM1/Histologie/P1\\_histo\\_006/Web/co/Module\\_DIFFERENCIATIONS\\_MEMBRANE\\_PLASMIQUE\\_10.html](http://www.dematice.org/ressources/PCEM1/Histologie/P1_histo_006/Web/co/Module_DIFFERENCIATIONS_MEMBRANE_PLASMIQUE_10.html))

### iii. Un rôle de filtre

Comme nous l'avons vu plus haut, la bicouche lipidique ne laisse passer que de petites molécules neutres hydrophiles ou hydrophobes telles que des molécules d'eau ou de dioxygène ou des molécules plus grosses mais hydrophobes telles que les enzymes lipidiques. Cependant, la cellule a besoin de nombreuses autres molécules qui peuvent être chargées ou non, petites ou plus grosses, pour fonctionner. Par exemple, la cellule a besoin d'ions et de glucose et la bicouche lipidique est pratiquement imperméable à ces molécules. Comment la cellule importe-t-elle ces molécules ? Ce sont des protéines membranaires spécifiques qui vont permettre l'internalisation de ces molécules. Cependant, il n'existe pas

de transporteurs protéiques pour toutes les substances donc les protéines membranaires ont bien un rôle de filtre sélectif. On parlera de diffusion impliquant des transporteurs ou de transport passif. Il existe trois grands types de protéines membranaires impliquées dans le transport passif de molécules vers le milieu intracellulaire :

- les canaux ioniques qui permettent l'entrée d'ions à travers un canal (détaillés ci-dessous),
- les aquaporines qui permettent l'entrée d'eau à travers un canal,
- les transporteurs permettant l'entrée de molécule par translocation tel que le transporteur au glucose.

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires composées de nombreuses hélices  $\alpha$  transmembranaires qui définissent un canal hydrophile. Ces canaux sont spécifiques à un type d'ions donné. Par exemple, il existe des canaux au potassium, des canaux au calcium, des canaux au sodium, etc.

Il est important de noter que ces transports passifs ne peuvent se faire que dans le sens du gradient électrochimique. En effet, la seconde loi de la thermodynamique rappelle que les molécules se déplacent spontanément de la zone où la concentration est la plus forte vers la zone où la concentration est la plus faible.

Le sens de déplacement d'un soluté à travers la membrane peut être prédit en calculant la variation d'énergie libre du système par l'équation :

$$\Delta G = RT_a \ln \frac{C_i}{C_o} + ZF \Delta E$$

où  $\Delta G$  est la variation de l'énergie libre du système,  $R$  est la constante des gaz parfaits,  $T_a$  est la température absolue (en °K),  $C_i$  est la concentration du soluté à l'intérieur du compartiment,  $C_o$  est la concentration du soluté à l'extérieur du compartiment,  $Z$  est la valence du soluté concerné,  $F$  est la constante de Faraday et  $\Delta E$  est la différence de charges entre les deux compartiments.

Lorsque  $\Delta G$  est négatif, la réaction est exergonique (spontanée) et exothermique (libère de l'énergie). Lorsque  $\Delta G$  est positif, la réaction a besoin d'un apport d'énergie (endergonique) pour pouvoir se produire. Ce résultat renseigne sur le sens spontané des échanges mais il ne donne aucune information sur la vitesse de la réaction.

Par ailleurs, l'équation de Nernst permet de calculer le potentiel électrochimique pour chaque composé ionique grâce à cette équation :

$$E_{A/B} = \frac{RT_a}{ZF} \ln \frac{C_B}{C_A}$$

Où  $E_{A/B}$  est la différence de potentiel entre les deux compartiments pour un ion donné,  $C_B$  est la concentration du soluté dans le compartiment B,  $C_A$  est la concentration du soluté dans le compartiment A.

Pour finir, quand la membrane est perméable à plusieurs solutés, le potentiel d'inversion ou différence de potentiel transmembranaire peut être calculé grâce à l'équation de Goldman, Hodgkin et Katz. Prenons l'exemple d'une membrane entourée par une solution comprenant du  $\text{Na}^+$ , de  $\text{K}^+$  et du  $\text{Cl}^-$ , le potentiel est :

$$E = \frac{RT_a}{F} \ln \frac{P_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_{\text{ext}} + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_{\text{ext}} + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_{\text{int}}}{P_{\text{Na}^+} [\text{Na}^+]_{\text{int}} + P_{\text{K}^+} [\text{K}^+]_{\text{int}} + P_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]_{\text{ext}}}$$

Où  $P_x$  est la perméabilité de la membrane à la substance X et  $[X]$  est la concentration en X. Le terme concernant  $\text{Cl}^-$  est inversé par rapport aux termes concernant  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  car la valence de  $\text{Cl}^-$  est de -1. La différence de potentiel transmembranaire est exprimée ici en mV.

## 5) La différence de potentiel transmembranaire de repos ou potentiel de membrane

Il existe un autre type de protéines membranaires capables de permettre le passage d'ions à travers la membrane : les pompes ioniques. Ce type de transport est appelé transport actif. Ces molécules ont la particularité de pouvoir coupler l'énergie chimique libérée par l'hydrolyse d'une molécule riche en énergie (comme l'ATP) à un transport de soluté contre son gradient électrochimique.

Par exemple, la pompe ATPase  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  consomme de l'ATP pour sortir constamment des ions  $\text{Na}^+$  de la cellule et permettre l'entrée d'ions  $\text{K}^+$  dans celle-ci. Ces deux ions sont déplacés contre leur gradient électrochimique grâce au couplage énergétique. A chaque cycle de la protéine, la pompe fixe trois ions  $\text{Na}^+$  dans le cytoplasme puis la protéine est phosphorylée par consommation d'une molécule d'ATP et change de conformation ce qui a pour conséquence de libérer les ions  $\text{Na}^+$  à l'extérieur de la cellule. Dans cette configuration, elle fixe deux ions  $\text{K}^+$  puis est déphosphorylée et change de nouveau de conformation et libère les deux ions  $\text{K}^+$  dans le cytoplasme. L'activité de cette pompe est essentielle au fonctionnement de la cellule. En effet, plus d'un tiers de l'ATP consommé par un animal au repos est utilisé pour le fonctionnement de cette pompe<sup>11</sup>.

De plus, suite à l'action de cette pompe, la concentration intracellulaire en  $K^+$  est 40 fois supérieure à la concentration extracellulaire<sup>11</sup> et puisque la membrane est très perméable au  $K^+$ , puisqu'il y a de nombreux canaux ioniques au  $K^+$ , il y a une fuite de cet ion à travers la membrane. Ces déplacements d'ions  $K^+$  dus à la pompe ATPase  $Na^+ - K^+$  sont à l'origine d'une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane, c'est la différence de potentiel dit de membrane. Ce potentiel est essentiel à de nombreux phénomènes cellulaires tels que la propagation des potentiels d'action dans les cellules nerveuses.

Cette différence de potentiel varie de -20 mV à -200 mV selon l'espèce et le type cellulaire<sup>30</sup> (les cellules végétales ont des différences de potentiels membranaires plus négatives que les cellules animales).

## **B. Les membranes des organites**

### **1) La compartimentation cellulaire chez les eucaryotes**

Contrairement aux cellules procaryotes qui ne possèdent qu'une membrane externe, les cellules eucaryotes ont la particularité de présenter un réseau de membranes intracellulaires qui définissent des espaces jouant des rôles propres. C'est la compartimentation cellulaire. Dans la plupart des cas, les cellules procaryotes ont une taille comprise entre 1 et 10  $\mu m$  alors que la taille des cellules eucaryotes est généralement comprise entre 10 et 100  $\mu m$ . Cette augmentation du volume de la cellule est à relier à une baisse de la probabilité de rencontre entre une molécule et son substrat. De plus, de nombreux processus biochimiques vitaux sont effectués au sein des membranes ou à leur surface. Ces processus impliquent des protéines liées à la membrane telles que les enzymes de la photosynthèse ou de la phosphorylation oxydative qui se situent respectivement dans les membranes des chloroplastes et des mitochondries.

Par conséquent, la compartimentation cellulaire permet d'augmenter la surface membranaire et donc la probabilité de rencontre entre une enzyme membranaire et son substrat mais elle permet aussi de regrouper des ensembles de molécules jouant un rôle identique dans un volume plus faible dédié à des fonctions spécifiques.

Cependant, chaque compartiment cellulaire doit pouvoir être approvisionné en molécules nécessaires à son fonctionnement mais il doit aussi pouvoir exporter les produits de son activité métabolique aux autres compartiments qui pourront s'en servir. Il existe donc un système d'adressage des molécules aux différents compartiments cellulaires. De plus, certains des compartiments cellulaires sont capables de libérer des vésicules ou de fusionner avec des vésicules provenant d'autres organites ce qui permet l'échange de grosses molécules d'un compartiment à un autre.

Les compartiments cellulaires sont définis en fonction de leur rôle et peuvent être classés aussi selon le nombre de membranes qui les délimitent du cytoplasme. Les organites à simple membrane sont :

- le réticulum endoplasmique lisse ou rugueux qui est impliqué dans le stockage de l'ion calcium, dans la synthèse des lipides, des protéines membranaires et des protéines solubles destinées aux autres compartiments cellulaires ou à la sécrétion,
- l'appareil de Golgi qui réceptionne les lipides et les protéines provenant du réticulum endoplasmique et qui est aussi un lieu de stockage, de maturation et de redistribution de ces lipides et de ces protéines,
- les peroxysomes qui sont des petites vésicules contenant des enzymes impliquées dans des réactions oxydatives,
- les lysosomes qui contiennent des enzymes permettant de dégrader et de recycler les organites dont certaines molécules ont été dénaturées ainsi que les macromolécules et les particules provenant de l'extérieur de la cellule par endocytose,
- et les endosomes qui sont les vésicules qui permettent d'acheminer les macromolécules et particules de l'extérieur de la cellule jusqu'aux lysosomes, jusqu'à l'appareil de Golgi ou jusqu'au cytoplasme lorsqu'il y a libération du contenu. Ces vésicules peuvent aussi être redirigées vers la membrane plasmique et le milieu extracellulaire.

Les organites à double membranes sont :

- les chloroplastes (présents chez les plantes) qui sont le lieu de la photosynthèse,
- les mitochondries (présentes chez toutes les cellules eucaryotes) qui permettent la phosphorylation oxydative et la conversion de l'énergie contenue dans les molécules nutritives (provenant de l'alimentation pour les animaux et de la photosynthèse pour les végétaux) en énergie utilisable par le reste de la cellule,
- le noyau qui est l'organite qui contient l'ADN et qui est délimité par une double membrane associée à une armature interne de protéines (les lamines) et à des pores nucléaires.

Le cytosol est aussi considéré comme un compartiment cellulaire.

Le Tableau 2 présente les pourcentages respectifs des volumes des différents compartiments cellulaires par rapport au volume total de la cellule dans le cas des hépatocytes.

Il est à noter que, d'après la théorie endosymbiotique, les mitochondries et les chloroplastes qui ont une double membrane, qui possèdent un ADN qui leur est propre et qui ont des

propriétés de divisions autonomes proviennent de l'internalisation d'une bactérie dans la cellule eucaryote ancestrale.

**Tableau 2 : Volume relatif occupé par les principaux compartiments intracellulaires dans une cellule hépatique (hépatocytes).** D'après Alberts (2004)<sup>12</sup>

Compartiment intracellulaire	Pourcentage du volume cellulaire total
Cytosol	54
Mitochondries	22
Citernes du réticulum endoplasmique rugueux	9
Citernes du réticulum endoplasmique lisse plus citernes de l'appareil de Golgi	6
Noyau	6
Peroxisomes	1
Lysosomes	1
Endosomes	1

## 2) Des différences de composition

Il existe des différences dans les compositions des membranes d'un type cellulaire à un autre mais aussi d'un organe à un autre. Comme le montre le Tableau 3, les différents organites d'une même souche de levure, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ont des compositions très différentes.

La PtdCho est peu présente dans la membrane plasmique (16,8 % des phospholipides) alors qu'elle représente plus de 50 % des phospholipides présents dans la membrane du réticulum endoplasmique (51,3 % des phospholipides). La PtdSer est présente en forte proportion dans la membrane plasmique (33,6 %) alors qu'il y en a très peu dans la mitochondrie (3 %). La CL est un phospholipide que l'on retrouve en proportion importante dans la mitochondrie et plus particulièrement dans la membrane interne (16,1 %) alors que dans les autres organites elle représente moins de 1,6 % des phospholipides, ou moins (à l'exception du peroxysome qui en contient 7,0 %).

Ces variations sont à relier aux origines des phospholipides et aux fonctions des différents organites. En effet, le réticulum endoplasmique est le lieu de la synthèse de certains phospholipides tels que la PtdSer et la PtdCho<sup>31</sup> ce qui pourrait expliquer la proportion importante de PtdCho dans les membranes du réticulum endoplasmique par rapport à la membrane plasmique. Cependant, même si la PtdSer est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, il y en a moins dans la membrane du réticulum endoplasmique que dans la

membrane plasmique car la PtdSer qui reste dans la membrane du réticulum endoplasmique peut être convertie en PtdCho à cet endroit d'où une accumulation de PtdCho aux dépens de la PtdSer.

**Tableau 3 : Compositions phospholipidiques des différentes fractions subcellulaires de *S. cerevisiae*.** D'après Zinser *et al.* (1991) <sup>32</sup>

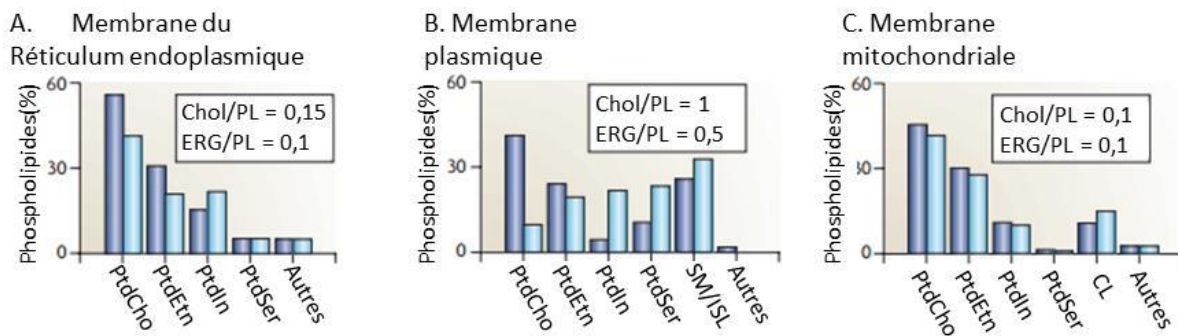
Fraction cellulaire	Pourcentage par rapport aux phospholipides totaux						
	PtdCho	PtdEtn	PtdIns	PtdSer	CL	PA	Autres
Membrane plasmique	16,8	20,3	17,7	33,6	0,2	3,9	6,9
Vacuoles de sécrétion	35,0	22,3	19,1	12,9	0,7	1,2	8,8
Vacuoles	46,5	19,4	18,3	4,4	1,6	2,1	7,7
Noyau	44,6	26,9	15,1	5,9	<1,0	2,2	4,3
Peroxisome	48,2	22,9	15,8	4,5	7,0	1,6	ND
Microsomes du réticulum endoplasmique	51,3	33,4	7,5	6,6	0,4	0,2	0,5
Mitochondrie	40,2	26,5	14,6	3,0	13,3	2,4	ND
Membrane interne de la mitochondrie	38,4	24,0	16,2	3,8	16,1	1,5	ND
Membrane externe de la mitochondrie	45,6	32,6	10,2	1,2	5,9	4,4	ND

CL : CardioLipine ; PA : Acide Phosphatidique ; Autres : autres phospholipides ; ND : Non Détectable

La mitochondrie synthétise spécifiquement d'une part la CL, qui n'est pas synthétisée ailleurs dans la cellule, et d'autre part la PtdEtn, par decarboxylation de la PtdSer <sup>32, 33</sup>. Comme la PtdSer est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, il doit donc y avoir un échange de phospholipides entre ces deux compartiments cellulaires. Il semblerait que cet échange se fasse par l'intermédiaire de zones de contact membranaires entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (les MAM, mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) <sup>34</sup>. Il en est de même pour les faibles proportions de CL retrouvées dans les membranes des organites autres que la mitochondrie mais l'échange se fait, dans ce cas, de la mitochondrie vers le réticulum endoplasmique. Il faut aussi noter que les glycophospholipides sont synthétisés dans l'appareil de Golgi qui peut ajouter des groupements glucidiques aux phospholipides synthétisés dans le réticulum endoplasmique. Il y a des différences importantes au niveau des compositions des membranes d'un organe à un autre mais aussi d'un organisme à un autre comme le montre la Figure 17.



On voit sur cette figure que la membrane plasmique est la membrane cellulaire où il y a la plus grande différence entre les cellules de mammifère et les cellules de levures. En effet, la PtdCho est majoritaire, dans la membrane plasmique, chez les mammifères alors qu'elle est minoritaire chez les levures. A l'inverse, le PtdIn et la PtdSer sont présents en fortes proportions chez les levures alors que ces phospholipides sont très minoritaires chez les mammifères.



**Figure 17 : Composition de différentes membranes cellulaires chez les cellules de mammifère et les cellules de levure.** Les compositions lipidiques sont exprimées en pourcentages par rapport aux lipides totaux. Les barres en bleu foncé correspondent aux cellules de mammifères et les barres bleues claires correspondent aux cellules de levure. Chol : cholestérol, PL : phospholipides, ERG : ergostérol, SM : sphingomyéline, ISL : sphingolipide inositol. Les ratios molaires entre le cholestérol (Chol, chez les mammifères) et l'ergostérol (ERG, chez les levures) par rapport aux PL sont aussi présentés en tant que mesures de contenus en stérols. D'après van Meer *et al.* (2008)<sup>35</sup>.

La différence de composition des différentes membranes des organites concerne les lipides comme décrit ci-dessus mais il y a aussi de grandes différences au niveau des protéines retrouvées dans ces différentes membranes.

### 3) Des membranes avec des rôles propres à chaque organite

Les différences de composition en phospholipides des différentes membranes entraînent une différence de sélectivité dans le passage de molécules à travers ces membranes (au niveau de la partie lipidique). Cette différence de sélectivité peut avoir un rôle avec la fonction de cet organite. Par exemple, la fuite de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie est un phénomène essentiel à son fonctionnement. Cette membrane est riche en CL et il a été montré que ce lipide entraîne une augmentation de la perméabilité aux protons (par rapport à une membrane composée seulement de PtdCho)<sup>36</sup>. Certaines protéines de la membrane interne de la mitochondrie sont aussi impliquées dans cette fuite de protons.

Certains organites ont des rôles spécifiques qui nécessitent la présence de protéines particulières. Par exemple, l'activité de phosphorylation oxydative de la mitochondrie est réalisée grâce aux protéines membranaires de la chaîne de transporteurs d'électrons mitochondriale que l'on ne retrouve qu'au niveau de la membrane interne des mitochondries. Il en est de même pour les chloroplastes qui ont pour rôle principal de réaliser la photosynthèse qui repose aussi sur les protéines membranaires de la chaîne de transporteurs d'électrons chloroplastique.

De plus, les variations de composition des membranes des différents organites (en terme de lipides et de protéines) changent la sélectivité dans le passage de molécules à travers ces membranes et est à l'origine de différences dans les potentiels transmembranaires de ces différents organites.

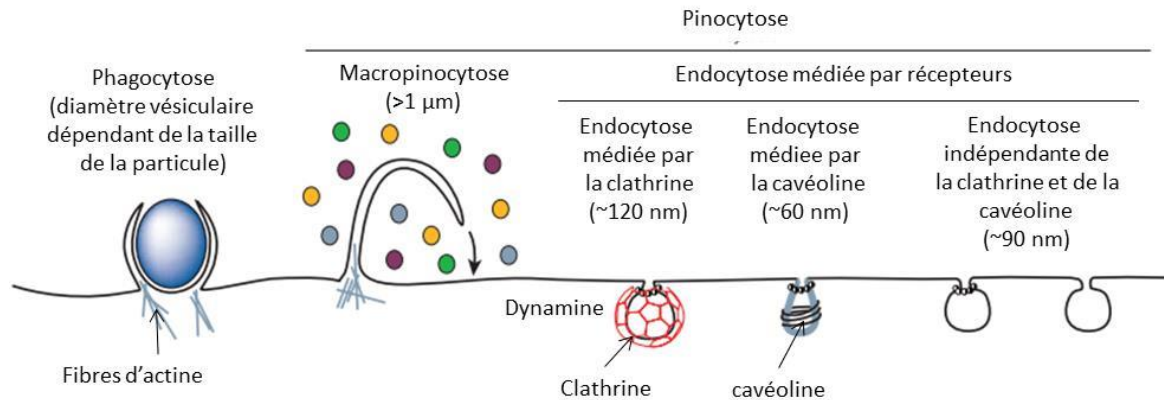
## **C. Continuité des membranes cellulaires**

Il existe une continuité dans les membranes cellulaires qui est à l'origine du renouvellement de la membrane plasmique mais aussi du transport des phospholipides de leur zone de synthèse (réticulum endoplasmique, mitochondrie ou appareil de Golgi) vers tous les autres organites. Cette continuité est assurée par les cytoses.

### **1) Les cytoses et les vésicules intracellulaires**

On différencie deux types de cytoses dans la cellule : l'endocytose, qui correspond à la mise en place de vésicules par invagination de la membrane plasmique (ce qui permet de prélever des grosses molécules ou des particules à l'extérieur de la cellule) et l'exocytose qui consiste en la fusion de vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique (ce qui permet de libérer des grosses molécules ou des particules dans le milieu extracellulaire). Il existe deux types d'endocytoses différenciés par la taille des particules introduites dans les vésicules : la phagocytose (de « phagein », manger en grec) qui internalise de grosses particules, et la pinocytose (de « pinein », boire en grec) qui internalise des particules, des solutés et du liquide. La phagocytose correspond à la formation de vésicules de diamètre supérieur à 250 nm <sup>37</sup>, capable d'internaliser de grosses particules, voire des cellules et comprenant une reconnaissance spécifique. La phagocytose a la particularité de reposer sur un mécanisme impliquant la polymérisation de l'actine sous la membrane ce qui permet l'émission de pseudopodes. La pinocytose correspond à des vésicules de diamètre inférieur à 150 nm (sauf pour la macropinocytose qui internalise des plus gros volumes). La pinocytose comprend différents types d'endocytose : la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par la cavéoline et l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline <sup>38</sup> (Figure 18). La phagocytose est réalisée par certaines

cellules spécialisées (les phagocytes) suite à la reconnaissance de la particule à phagocytter qui seront alors dégradées et transformées en petites particules solubles alors que la macropinocytose est un mécanisme aspécifique retrouvé chez presque toutes les cellules. De plus, la phagocytose n'internalise presque pas de fluide<sup>39</sup>.



**Figure 18 : Les multiples voies d'endocytose chez la cellule animale.** D'après Conner et Schmid (2003)<sup>38</sup>

La phagocytose peut avoir différents rôles. C'est une forme d'alimentation chez les protozoaires, alors que chez la plupart des animaux pluricellulaires, la phagocytose est réalisée par des cellules spécialisées et a un rôle de défense contre les microorganismes.

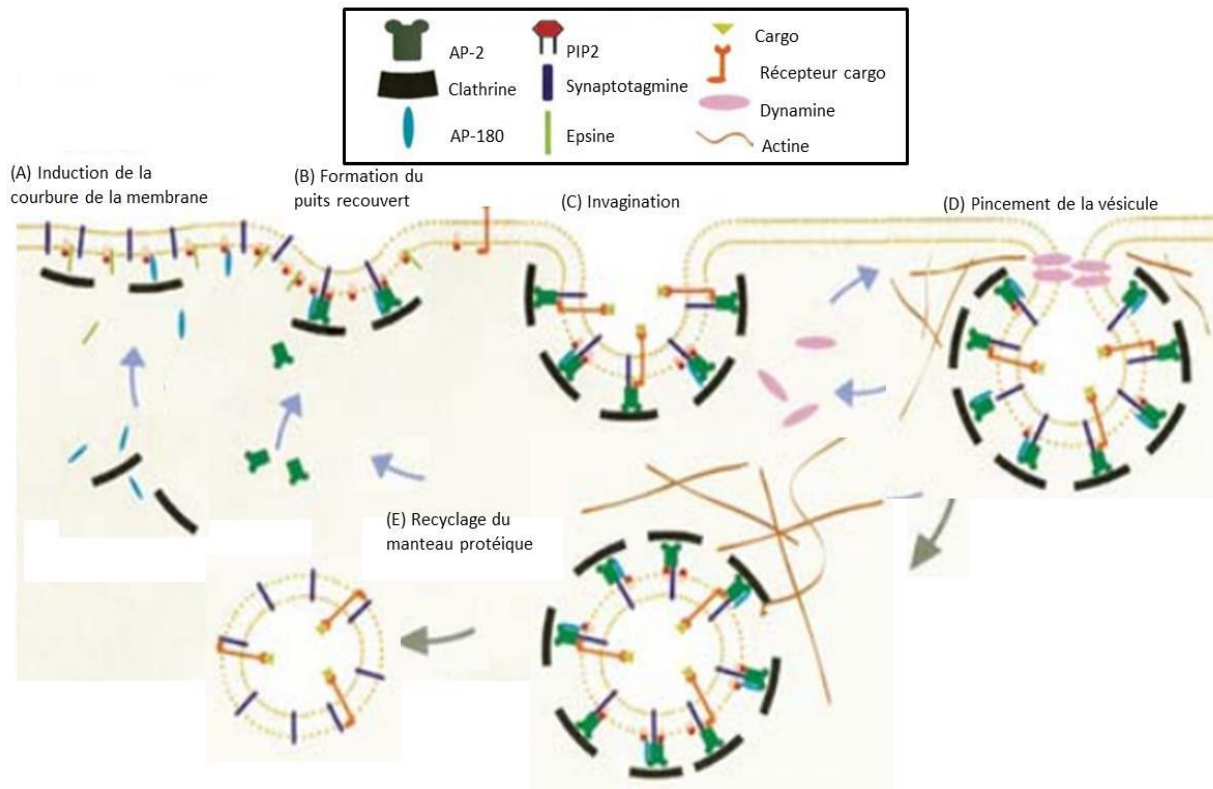
La macropinocytose repose aussi sur la polymérisation de l'actine cependant les mécanismes moléculaires de ce type d'endocytose sont mal connus. Certaines bactéries injectent des toxines dans leurs cellules cibles pour provoquer la macropinocytose et entraîner leur internalisation dans la cellule visée et leur permettre de se diviser<sup>40</sup>.

L'endocytose médiée par récepteurs est basée sur la reconnaissance des molécules à endocyter. Dans ce cas, des récepteurs membranaires reconnaissent et lient des ligands ce qui a pour conséquence de former une invagination de la membrane à l'origine d'une vésicule (Figure 19). Les vésicules ainsi formées peuvent être recouvertes d'un manteau protéique ou non.

Il existe différentes protéines de manteau. Les vésicules recouvertes de clathrine ont été observées par Roth et Porter en 1964<sup>41</sup>. L'endocytose médiée par clathrine est constitutive chez tous les mammifères. Elle permet une internalisation continue de nutriments tels que le cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (ou LDL pour Low Density Lipoprotein en anglais) qui reconnaissent et fixent les récepteurs aux LDL. L'endocytose médiée par clathrine permet aussi l'internalisation des canaux voltage dépendants au  $\text{Ca}^{2+}$  des neurones et donc le contrôle de la transmission du message synaptique<sup>42</sup>.

Ces protéines de manteau qui sont liées aux membranes cellulaires permettent la création de vésicules par bourgeonnement grâce à leur capacité à s'assembler et à créer des

structures en panier<sup>37</sup>. Par exemple, la clathrine est une protéine constituée de trois grosses chaînes polypeptidiques et de trois petites, et forme une structure à trois bras appelés triskélions. Les triskélions sont capables de s'assembler et ainsi de créer le manteau recouvrant une vésicule (Figure 20).

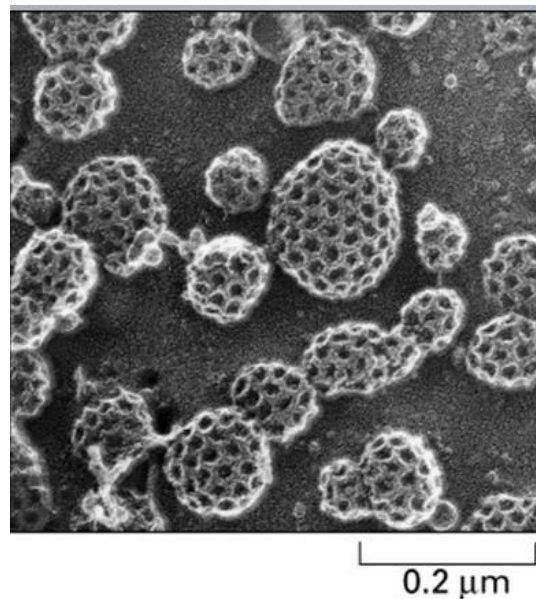


**Figure 19 : Modèle simplifié des différentes étapes de la voie avec puits à clathrine de l'endocytose médiée par récepteur.** Le complexe AP-2 est un complexe de quatre adaptines qui lie la clathrine et la synaptotagmine, une protéine transmembranaire. L'AP-180 est une protéine qui se fixe à la clathrine d'un côté et aux phospholipides de l'autre. L'epsine est une protéine membranaire impliquée dans l'induction de la courbure de la membrane à condition qu'elle se fixe à des sites riches en PIP2 (phosphatidylinositol 4-5-bisphosphate). De plus, l'epsine recrute la clathrine ainsi que le complexe AP-2 jusqu'au site d'endocytose où le complexe AP-2 (avec les protéines adaptatives AP180) induit l'assemblage de la cage de clathrine. Le récepteur cargo est le récepteur qui fixe les protéines cargo à endocyter. D'après Mousavi *et al.* (2004)<sup>43</sup>.

Le manteau des vésicules recouvertes de clathrine est aussi composé de protéines adaptatrices qui forment une seconde couche du manteau. Ces protéines lient le manteau de clathrine à la membrane sous-jacente et permettent aussi de recruter certaines protéines membranaires qui piègent les molécules qui doivent être internalisées. On appelle ces protéines les protéines de chargement<sup>37</sup>.

La fermeture des vésicules ainsi formées est réalisée grâce à la dynamine qui s'assemble en anneau autour du col du bourgeon de la membrane<sup>37</sup>. La fusion de deux vésicules ou d'une

vésicule avec un organite est médiée par deux types de protéines : les protéines v-SNARE et t-SNARE. Les protéines v-SNARE sont des protéines membranaires présentes dans la vésicule et exposées après le détachement des protéines du manteau alors que les protéines t-SNARE sont présentes sur la membrane des organites cibles des vésicules. Ces deux protéines s'assemblent spécifiquement et permettent la juxtaposition des deux membranes qui peuvent ainsi fusionner<sup>44</sup>.



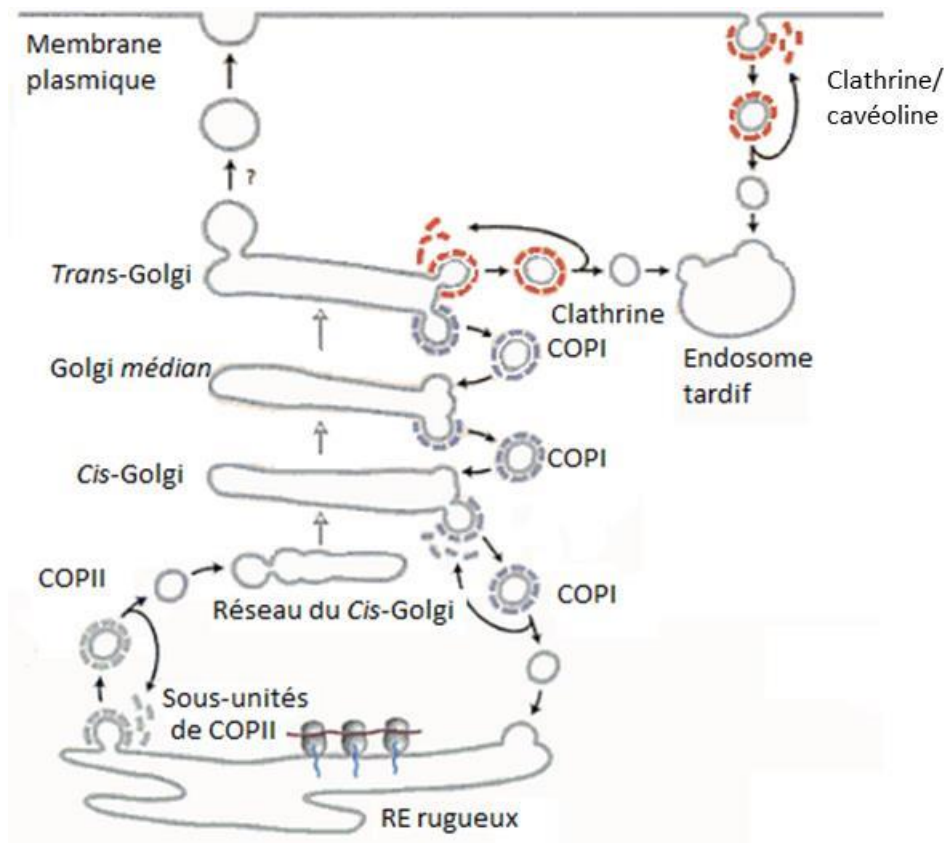
**Figure 20 : Electronographie de puits et de vésicules recouverts de clathrine.** Source : Heuser (1980)<sup>45</sup>

Les cavéolines sont des protéines de 22 kDa<sup>46</sup> retrouvées sur les cavéoles ou (caveolae). Elles s'insèrent dans le feuillet interne de la membrane et se lient au cholestérol. Les cavéolines se situent donc majoritairement au niveau des radeaux lipidiques<sup>47</sup> (Cf. I. D.). Il a été montré que les cavéoles sont impliquées dans le transport des protéines. De plus, ces vésicules peuvent intervenir dans l'endocytose mais aussi dans la transcytose (passage de molécules piégées dans une vésicule à travers une cellule).

Ces vésicules peuvent fusionner avec les autres vésicules de l'endosome une fois que les protéines de manteau se sont détachées (pour être recyclées).

Il existe d'autres types de vésicules. En effet, certaines vésicules impliquées dans la continuité des membranes bourgeonnent à la surface de certains organites et rejoignent d'autres organites ou la membrane plasmique. Ce sont des vésicules de transport. La plupart des vésicules de transport sont formées grâce à des zones de membranes recouvertes d'un manteau protéique qui peut être composé, entre autres, de clathrine, de cavéoline (comme pour les vésicules d'endocytose) mais aussi de protéines COPI ou COPII. Ces différents manteaux n'interviennent pas dans les mêmes étapes du trafic vésiculaire (Figure 21). En

effet, les vésicules à clathrine sont retrouvées entre la membrane plasmique, l'endosome tardif et l'appareil de Golgi. Les vésicules recouvertes de protéine COPI se situent au niveau de l'appareil de Golgi. Pour finir, les protéines COPII sont présentes sur les vésicules assurant le trafic entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.



**Figure 21 : Implications des quatre types principaux de protéines de manteaux dans le trafic vésiculaire au long des voies sécrétoires et endocytaires.** D'après Lodish *et al.* (2005)<sup>44</sup>

## 2) Le rôle du cytosquelette dans le transport vésiculaire

Les vésicules d'endocytose ou d'exocytose se déplacent au sein de la cellule. Ces déplacements se font le long des microtubules et sont assurés par des protéines motrices : les kinésines et les dynéines. Il existe plusieurs familles de ces deux types de molécules. Ces molécules sont capables de se fixer à la membrane des vésicules par une extrémité et aux microtubules par l'autre extrémité. Les kinésines se déplacent vers l'extrémité plus des microtubules (donc vers l'extérieur de la cellule) alors que les dynéines se déplacent vers l'extrémité moins (donc vers l'intérieur de la cellule). Ces protéines utilisent l'ATP, comme source d'énergie, pour se déplacer et permettre le mouvement des vésicules<sup>48</sup>.



## **D. Présence de radeaux lipidiques**

Il a longtemps été supposé que les lipides étaient tous mélangés aléatoirement dans la bicouche lipidique jusqu'en 1988 où Simons et Van Meer ont introduit la notion de radeaux lipidiques <sup>49</sup> (ou lipid raft en anglais) qui sont des assemblages de cholestérol, de sphingolipides et de certains phospholipides composés d'acides gras saturés. Ces radeaux font en général une cinquantaine de nm de diamètre <sup>13</sup>. Ces zones ne sont pas solubles dans les détergents contrairement au reste de la membrane plasmique. Ces lipides sont en phase liquide ordonnée ( $\ell_o$ ) et certaines protéines membranaires se concentrent dans ces zones plus compactes que le reste de la membrane plasmique. Ces radeaux se déplacent librement dans la membrane plasmique d'où leur nom. L'hypothèse de la présence de radeaux lipidiques a été vérifiée par microscopie en marquant certains lipides et certaines protéines à ancrage lipidique. Il a été montré que ces molécules ne sont pas réparties de manière aléatoire dans toute la membrane plasmique mais sont retrouvées dans des agrégats de la membrane plasmique <sup>50</sup>. La présence de ces radeaux lipidiques est importante car ils sont impliqués dans la signalisation cellulaire et dans l'adressage membranaire <sup>51</sup>.

## **II. Perméabilisation de la membrane plasmique**

La membrane plasmique permet de garantir l'intégrité de la cellule grâce à la cohésion des molécules qui la composent. Cependant, il peut être intéressant de détruire de manière réversible ou non cette intégrité pour faire entrer ou sortir des molécules qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique à l'état naturel. Cela peut être utile pour faire entrer des médicaments par exemple. Différentes techniques ont été développées pour perméabiliser la membrane plasmique et les mécanismes permettant de perméabiliser la membrane sont toujours en cours d'étude.

### **A. Observation de la perméabilisation de la membrane plasmique**

Que la membrane plasmique soit perméabilisée par des agents chimiques ou physiques il faut pouvoir visualiser cette perméabilisation. Il existe différents marqueurs pour lesquels la membrane est peu perméable à l'état basal et qui permettent de suivre directement ou indirectement la perméabilisation de la membrane plasmique. Ces marqueurs peuvent être de tailles et de natures différentes et peuvent être suivis par différentes techniques.

#### **1) Observation par techniques optiques**

##### **a) Marqueurs de petite taille**

La plus petite molécule capable de rentrer dans les cellules après perméabilisation et que l'on peut observer est l'eau. En effet, lorsque les cellules sont perméabilisées, il est possible de visualiser un gonflement des cellules qui traduit une entrée d'eau <sup>52, 53</sup>. Même si les milieux intracellulaires et extracellulaires ont la même osmolarité, il faut noter que toutes les molécules impliquées dans l'osmolarité ne sont pas mobiles ce qui est à l'origine d'un déséquilibre ionique même en conditions iso-osmotiques. C'est la théorie des colloïdes <sup>54, 55</sup>. Cette théorie explique que certaines grosses molécules chargées (telles que des protéines intracellulaires) sont piégées dans la cellule alors que d'autres ions tels que les ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  sont très mobiles et se déplacent dès qu'il y a perméabilisation de la membrane plasmique entraînant un déséquilibre dans le gradient électrochimique, déséquilibre qui est compensé par l'entrée d'eau dans la cellule. Le grossissement des cellules après avoir été exposées à un agent perméabilisant est donc un marqueur de perméabilisation cellulaire utilisé dans plusieurs études <sup>37, 53</sup>.

Certains ions de petite taille dont la concentration intracellulaire est faible tels que le  $Ca^{2+}$  peuvent aussi permettre de visualiser la perméabilisation cellulaire grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents dont la fluorescence dépend de la concentration de  $Ca^{2+}$  avoisinant



la molécule fluorescente<sup>53, 56, 57</sup>. Le Fluo-4, l'Indo-1, le Calcium Green ou le Fura-2 sont des exemples de marqueurs fluorescents permettant le suivi de l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules après perméabilisation (cf.III.B. 1)).

L'entrée d'eau s'observe quelques minutes après l'application d'un agent perméabilisant perméabilisation alors que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est visible quelques secondes après l'application de cet agent permabilisant. Cette information est à relier au nombre de molécules qui doivent avoir été internalisées pour que le signal soit détectable. En effet, il faudra une entrée massive de molécules d'eau dans la cellule pour voir un gonflement cellulaire alors que l'entrée d'un plus petit nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  est suffisante pour être détectée car la concentration interne en  $\text{Ca}^{2+}$  est très faible (environ 100 nM) et les marqueurs fluorescents de calcium réagissent à des petites variations de la concentration calcique. De plus, les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme et du milieu extracellulaire sont très différentes (respectivement environ 100 nM contre 1 mM) ; donc, lorsqu'il y a perméabilisation, il y a un grand nombre de molécules qui se déplacent avec une cinétique rapide de la zone la plus concentrée vers la zone la moins concentrée.

#### b) Marqueurs de taille moyenne

Le Thallium ( $\text{Tl}^+$ ) est un ion volumineux qui peut être utilisé indirectement pour suivre la déstabilisation de la membrane en étant associé à un fluorophore préchargé dans le cytoplasme et activable par le  $\text{Tl}^+$ . Dans ce cas, il y a augmentation de la fluorescence cytoplasmique lorsque la cellule est perméabilisée en présence de  $\text{Tl}^+$  extracellulaire<sup>58</sup>.

La perméabilisation cellulaire peut aussi être suivie par des marqueurs de perméabilisation fluorescents tels que le Lucifer Yellow (LY)<sup>59, 60</sup> ou la calcéïne<sup>61, 62</sup> qui sont des molécules intrinsèquement fluorescentes auxquelles la membrane plasmique n'est pas ou est peu perméable. Dans le cas du LY, lorsqu'il y a perméabilisation de la membrane plasmique, la molécule contenue dans le milieu extracellulaire peut rentrer dans le cytoplasme. Dans le cas de la calcéïne, le principe est un peu différent. La calcéïne peut être préchargée dans la cellule grâce à des groupements AcétoxyMéthyl (AM) liés par des liaisons ester à la molécule de calcéïne. Ces groupements AM permettent à la calcéïne de traverser la membrane. Ensuite, ces groupements sont coupés dans le cytoplasme par des estérases, ce qui piège la calcéïne à l'intérieur de la membrane. Dans ce cas c'est la sortie de la calcéïne à laquelle la membrane n'est pas perméable qui sera suivie lors de la perméabilisation de la membrane plasmique.

Par ailleurs, la membrane peut récupérer et se refermer ce qui permet de visualiser les cellules ayant internalisé la molécule, lorsque celles-ci ne peuvent pas diffuser librement à travers la bicouche (après élimination de la molécule dans le milieu extracellulaire).

Il existe un autre type de marqueurs fluorescents permettant de visualiser la perméabilisation cellulaire : les intercalants de l'ADN auxquels la membrane n'est pas perméable comme l'ion propidium issu de la dissociation de l'Iodure de Propidium (IP)<sup>63, 64, 65</sup>, ou l'ion Yo-Pro.<sup>53, 66</sup> Ces molécules sont très peu fluorescentes quand elles sont libres mais lorsqu'elles rentrent dans la cellule, elles se lient à l'ADN ce qui les place dans un microenvironnement hydrophobe et permet une augmentation drastique de la fluorescence.

L'internalisation des molécules telles que le  $TI^+$ , le LY et la calcéine est visualisable dans les minutes qui suivent la perméabilisation. Dans le cas des marqueurs fluorescents se fixant à l'ADN, leur entrée est visualisable en quelques  $\mu s$ <sup>67</sup> mais il faut attendre 10 à 40 minutes pour avoir un marquage total de l'ADN et que toutes les cellules exposées soient marquées puisque les marqueurs de l'ADN doivent diffuser dans la cellule et atteindre le noyau pour pouvoir être visualisés.

Il est aussi possible de suivre la perméabilisation cellulaire en utilisant une molécule toxique qui, lorsqu'elle est internalisée en quantité suffisante, entraîne la mort cellulaire. La bléomycine, un médicament anticancéreux entraînant la mort cellulaire lorsqu'il est internalisé, est souvent utilisée dans le cas de la perméabilisation basée sur l'application de champs électriques<sup>68, 69</sup>. Il a été montré que quelques centaines de molécules de bléomycine internalisées sont suffisantes pour entraîner la mort de la cellule<sup>59</sup>. Cette approche permet d'avoir une information quantitative sur le nombre de molécules internalisées<sup>59</sup>.

Le bleu de trypan peut aussi être utilisé pour observer la perméabilisation des cellules. Ce colorant bleu est normalement exclu par les cellules vivantes et s'accumule dans les cellules mortes. Lorsque les cellules sont perméabilisées, une entrée massive de bleu de trypan est observée<sup>70</sup>.

### c) Marqueurs de grande taille

Les acides nucléiques tels que des petits ARN interférents (siARN), des oligonucléotides, des ARN messagers ou des molécules d'ADN linéaires ou circulaires peuvent être introduits dans les cellules grâce à des agents chimiques ou physiques dans le cadre de la thérapie génique, par exemple. Ce phénomène peut aussi être utilisé pour suivre l'entrée de ces grosses molécules et mettre en évidence la perméabilisation de la membrane plasmique. En effet, des molécules telles que des siARN fluorescents<sup>71</sup>, des gènes délétères (comme le gène déficient de la Thymidine Kinase (TK))<sup>72</sup> ou des gènes rapporteurs peuvent être utilisés. L'entrée des siARN est visualisée directement par l'activité du fluorophore lié à la séquence d'acides nucléiques alors que l'entrée de gènes s'observe de manière indirecte puisqu'il faut qu'il y ait expression d'une protéine fonctionnelle (qui apporte à la cellule une fonction qui était absente avant la transfection) ou d'une protéine visualisable soit par

bioluminescence (cas du plasmide codant pour la luciférase)<sup>73, 74</sup> soit par fluorescence (cas du plasmide codant pour la Green Fluorescent Protein, GFP)<sup>75</sup> ou encore par absorbance (cas du plasmide codant pour la  $\beta$ -galactosidase)<sup>63</sup>. Dans ce cas, l'observation de la perméabilisation se fait à partir de 24h après l'application de l'agent perméabilisant jusqu'à quelques jours après car il faut que l'ADN atteigne le noyau et y soit traduit.

## 2) Observation par technique électrique

Le patch-clamp est une technique d'électrophysiologie qui permet de mesurer les courants ioniques traversant une membrane grâce à l'utilisation de deux électrodes (une à l'intérieur de la cellule et l'autre à l'extérieur). La technique du patch-clamp peut aussi être utilisée pour suivre la perméabilisation des membranes. La conductivité de la membrane est mesurable en patch-clamp et elle varie lors de la perméabilisation membranaire. Cette méthode est très sensible et elle revient à suivre très finement le passage des ions à travers la membrane ce qui est une preuve de la perméabilisation de la membrane. Cette technique peut être utilisée sur des cellules<sup>76, 77</sup> ou sur des bicouches lipidiques artificielles<sup>78</sup>. Il est aussi possible de mesurer les variations de la conductivité *in vivo* et *in vitro* grâce à la mesure d'impédance<sup>79, 80</sup>.

## 3) Notion de perméabilisation à une molécule donnée

Il faut noter que les conditions de perméabilisation nécessaires pour visualiser l'entrée de petites molécules telles que l'eau ou le calcium sont moins intenses que celles nécessaires pour permettre l'entrée de molécules plus grosses. Les tailles des différents marqueurs détaillés ci-dessus varient de 18 Da à plusieurs millions de Da (Tableau 4). Les propriétés physico-chimiques et la conformation des marqueurs influenceront également leur efficacité à détecter la perméabilisation.

Par exemple, il a été montré que l'application d'impulsions de 600 ns et de 100-200 kV.m<sup>-1</sup> permet de perméabiliser plusieurs types cellulaires au TI<sup>+</sup> sans qu'il n'y ait d'entrée de Yo-Pro ou d'IP<sup>58</sup>. Dans ce cas, cette observation est à relier à l'encombrement stérique du marqueur suivi et à la taille des perturbations créées dans la membrane. Plus le marqueur est volumineux, plus il faut que la perturbation soit intense pour permettre l'entrée du marqueur. Il est donc important de parler d'une perméabilisation à une molécule donnée et non pas de perméabilisation dans le sens absolu. En effet, dans certains cas, si le marqueur utilisé pour détecter la perméabilisation est une molécule qui n'est pas internalisée suite à l'application d'impulsions électriques données, cela ne veut pas dire que la membrane n'est pas rendue perméable à d'autres molécules. De plus, la sensibilité de la méthode de détection du marqueur peut aussi être très différente d'un marqueur à un autre. Ce paramètre doit aussi

être pris en compte lorsque différents marqueurs de perméabilisation sont utilisés dans le but de faire une comparaison.

**Tableau 4 : Poids des principaux marqueurs de perméabilisation**

Molécule	Poids (Da)
Eau	18
Calcium	40
Thallium (ion)	204
Yo-Pro (ion)	375
Lucifer Yellow (ion)	443
Ion Propidium (ion)	541
Calcéine	623
Bleu de trypan	965
Bléomycine	1 500
SiARN	~14 000
plasmide	~3 000 000

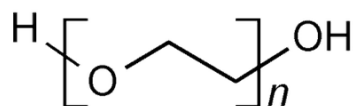
## **B. Perméabilisation par des agents chimiques**

Il existe différents types d'agents perméabilisants réversibles (saponine, polyéthylènes glycols, diméthylsulfoxyde ainsi que d'autres polymères) ou irréversibles (Triton-X100, par exemple). La perméabilisation réversible peut être utilisée dans le domaine de la vectorologie contrairement à la perméabilisation irréversible qui détruit les cellules. Deux types d'agents perméabilisants chimiques réversibles sont détaillés ci-dessous car ils ont été ou sont souvent utilisés en biologie : les polyéthylènes glycols (PEG) et le diméthylsulfoxyde (DMSO).

### **1) Les polyéthylènes glycols**

#### **a) Structure**

Les polyéthylènes glycols (PEG) sont des polymères de fonctions éther linéaires dont le poids moléculaire est inférieur à 20 000 g.mol<sup>-1</sup> (Figure 22). Ils proviennent de la polymérisation de l'éthylène glycol HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH.



**Figure 22 : Structure des polyéthylènes glycols**

Les propriétés physico-chimiques des PEG dépendent du nombre d'unités d'éthylènes glycols de la molécule et par conséquent de la masse molaire de la molécule. Les PEG sont miscibles à l'eau.

#### a) Utilisations en biologie

Les PEG sont utilisés pour réaliser des fusions cellulaires, pour perméabiliser les membranes biologiques ainsi que pour permettre la circulation systémique du complexe d'ADN (rend le complexe non repérable par le système immunitaire).

Les premières fusions de cellules artificiellement produites ont été réalisées grâce au virus de Sendai dans les années 60<sup>81, 82</sup>. Ce virus peut être inactivé grâce aux rayons ultraviolets ou à la β-propiolactone tout en gardant son pouvoir hémagglutinant et fusionnant. Pour éviter les risques de prolifération de ce virus, l'utilisation de PEG a peu à peu remplacé l'utilisation du virus de Sendaï dans les années 1970<sup>83, 84</sup>. En effet, l'utilisation de PEG pour faire fusionner des cellules a l'avantage d'induire une fusion rapide (quelques minutes à 37°C) et d'être moins toxique que le virus de Sendaï.

A la fin des années 70, il a été montré dans différents travaux que les PEG peuvent être utilisés pour perméabiliser les membranes plasmiques et permettre l'entrée d'ADN dans les cellules. Bibb *et al.* (1978) ont publié un article présentant les propriétés de transfection du PEG 1000 en travaillant sur des protoplastes de *Streptomyces coelicolor*<sup>85</sup>. L'année suivante, Chang *et al.* (1979) ont observé jusqu'à 80% de rendement de transformation de protoplastes de *Bacillus subtilis* par de l'ADN plasmidique en les soumettant à une incubation de 2 min en présence de 40% (poids/volume) de PEG 6000<sup>86</sup>. Actuellement cette propriété des PEG n'est plus beaucoup exploitée puisque d'autres méthodes de transfection et de fusion plus efficaces et plus simples ont été développées telles que l'électroperméabilisation ou l'électrofusion (cf.II.D.3)

Actuellement, les PEG sont surtout utilisés pour leur absence de toxicité et leur furtivité en tant que polymères non-ioniques pour recouvrir des nanoparticules permettant l'acheminement de médicaments<sup>87</sup> ou d'ADN<sup>88</sup> dans les cellules.

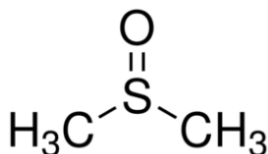
### b) Mode d'action

Ahkong *et al.* ont étudié le mécanisme d'action des PEG et ont émis l'hypothèse que ce composé diminue les forces répulsives qui existent entre les érythrocytes, sur lesquels ils ont travaillé, ce qui permet un rapprochement des cellules entre elles et une agrégation de celles-ci. D'après ces travaux, le PEG aurait aussi la capacité de déshydrater les membranes de manière à créer des zones localisées où la fusion peut apparaître. Il y aurait création d'une structure intermédiaire de lipides qui ne serait pas une bicouche lipidique mais seulement une seule couche de lipides. Puis cet événement se propagerait pour arriver à l'état de fusion des deux cellules<sup>89</sup>. Cette idée a été validée plus tard par différents travaux comme ceux d'Evans *et al.* qui ont publié un article en 2002 expliquant aussi la fusion médiée par les PEG par une déshydratation de l'extérieur de la membrane plasmique permettant un contact entre les membranes ainsi que par un abaissement de l'énergie nécessaire au mélange des lipides des deux membranes mises en contact<sup>90</sup>.

## 2) Le Diméthylsulfoxyde

### a) Structure

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant organique aprotique, polaire, miscible à l'eau, de formule brute  $C_2H_6OS$  (Figure 23) et de masse molaire  $78,13 \text{ g.mol}^{-1}$ .



**Figure 23 : Structure du DMSO**

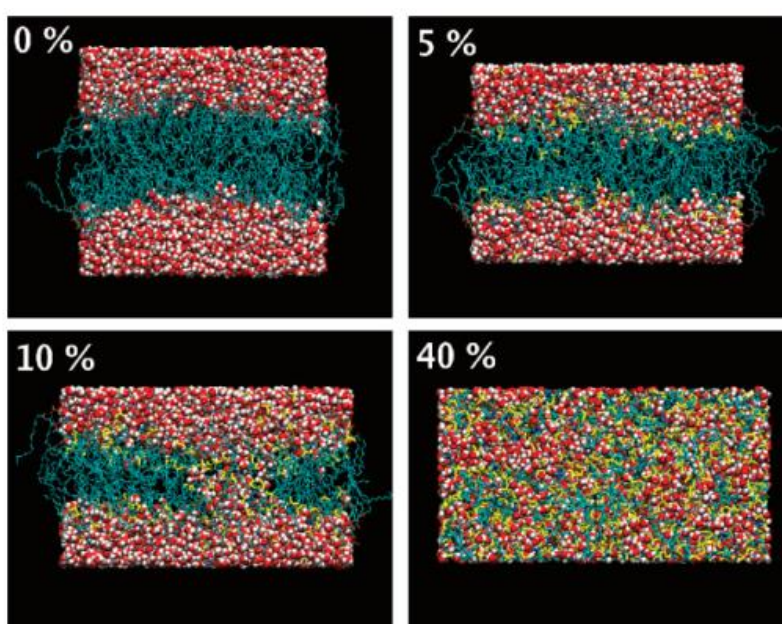
Ce solvant a la particularité d'avoir une température de fusion assez élevée ( $18,5^\circ \text{C}$ ) et se présente comme un liquide incolore au-dessus de cette température.

### b) Utilisations en biologie

Le DMSO est utilisé comme agent cryoprotecteur pour la congélation de cellules<sup>91, 92</sup>, de gamètes<sup>93, 94</sup>, d'embryons<sup>95, 96, 97</sup> et d'organes<sup>98</sup>. Il possède aussi des propriétés de perméabilisation des membranes<sup>53, 99</sup> et de la peau<sup>100, 101</sup> et des propriétés anesthésiques<sup>102, 103</sup>. Il est aussi utilisé comme solvant pour transporter des médicaments<sup>104, 105</sup> ou comme piège à ROS (Reactive Oxygen Species)<sup>106</sup>. De plus le DMSO peut permettre de générer des fusions cellulaires<sup>107</sup>.

### c) Mode d'action dans le cadre de la perméabilisation membranaire

Les études faites pour comprendre les changements au niveau des lipides de la membrane en présence de DMSO ont révélé que le DMSO remplaçait les molécules d'eau présentes entre les têtes des phospholipides <sup>108</sup>. Ceci entraîne, pour certaines concentrations de DMSO, une augmentation de la surface membranaire ainsi qu'une diminution de l'épaisseur membranaire comme il est visible sur la Figure 24 <sup>109</sup>. En fait, il a été montré par la DM que le DMSO possède trois modes d'action distincts sur les bicouches lipidiques en fonction de la concentration appliquée. A faible concentration, le DMSO entraîne une diminution de l'épaisseur de la membrane et augmente la fluidité de celle-ci. A une concentration plus importante, le DMSO génère des pores hydrophiles dans la membrane.



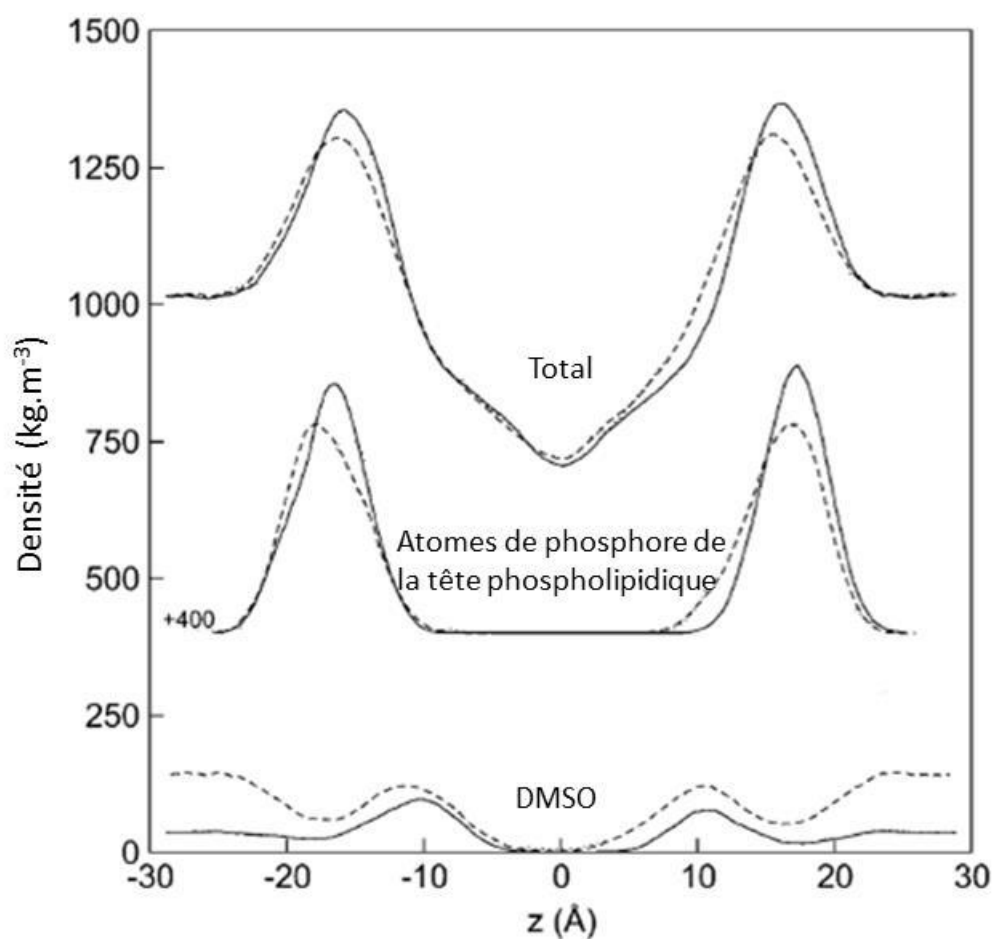
**Figure 24 : Les différents modes d'action du DMSO sur les membranes phospholipidiques.** Vues de côté des structures finales après simulation des systèmes de bicouches contenant 0, 5, 10 et 40 mol% de DMSO. Les lipides sont représentés en cyan, l'eau en rouge et le DMSO en jaune. Source : Gurtovenko et Anwar (2007) <sup>110</sup>.

Pour finir, à une concentration encore plus importante, les lipides sont désorbés de la membrane, ce qui est suivi par une destruction de celle-ci.

Les résultats expérimentaux ont été confirmés par des travaux de Dynamique Moléculaire (DM) qui montrent que le DMSO s'insère préférentiellement sous la tête des phospholipides, à l'interface des zones hydrophile et hydrophobe (Figure 25) <sup>111</sup>. Ces profils dépendent de la température.

Par ailleurs, ces profils dépendent aussi de la concentration en DMSO dans la bicouche lipidique (Figure 26) <sup>110</sup>. Jusqu'à 10 mol% de DMSO dans la membrane, une insertion de DMSO à l'interface des têtes et des chaînes carbonées des phospholipides est observée.

Au-dessus de cette concentration, la membrane commence à être déstabilisée pour finalement être complètement détruite.



**Figure 25 : Profils de densité du DMSO à 5 mol% dans une bicouche de DPPC.** Profils aux températures de 325°K (ligne pleine) et de 400°K (ligne pointillée). D'après Sum et de Pablo (2003) <sup>111</sup>.

Toutes ces observations suggèrent une augmentation de la perméabilité membranaire en présence de DMSO, ce qui a été décrit en détail par les simulations de dynamique moléculaire. Gurtovenko *et al.* ont montré une augmentation de la perméabilité membranaire due à l'effet du DMSO par l'intermédiaire de la création de pores hydrophiles dans des modèles de DM atomistiques <sup>110, 112</sup> et à « gros grains » <sup>113</sup>.



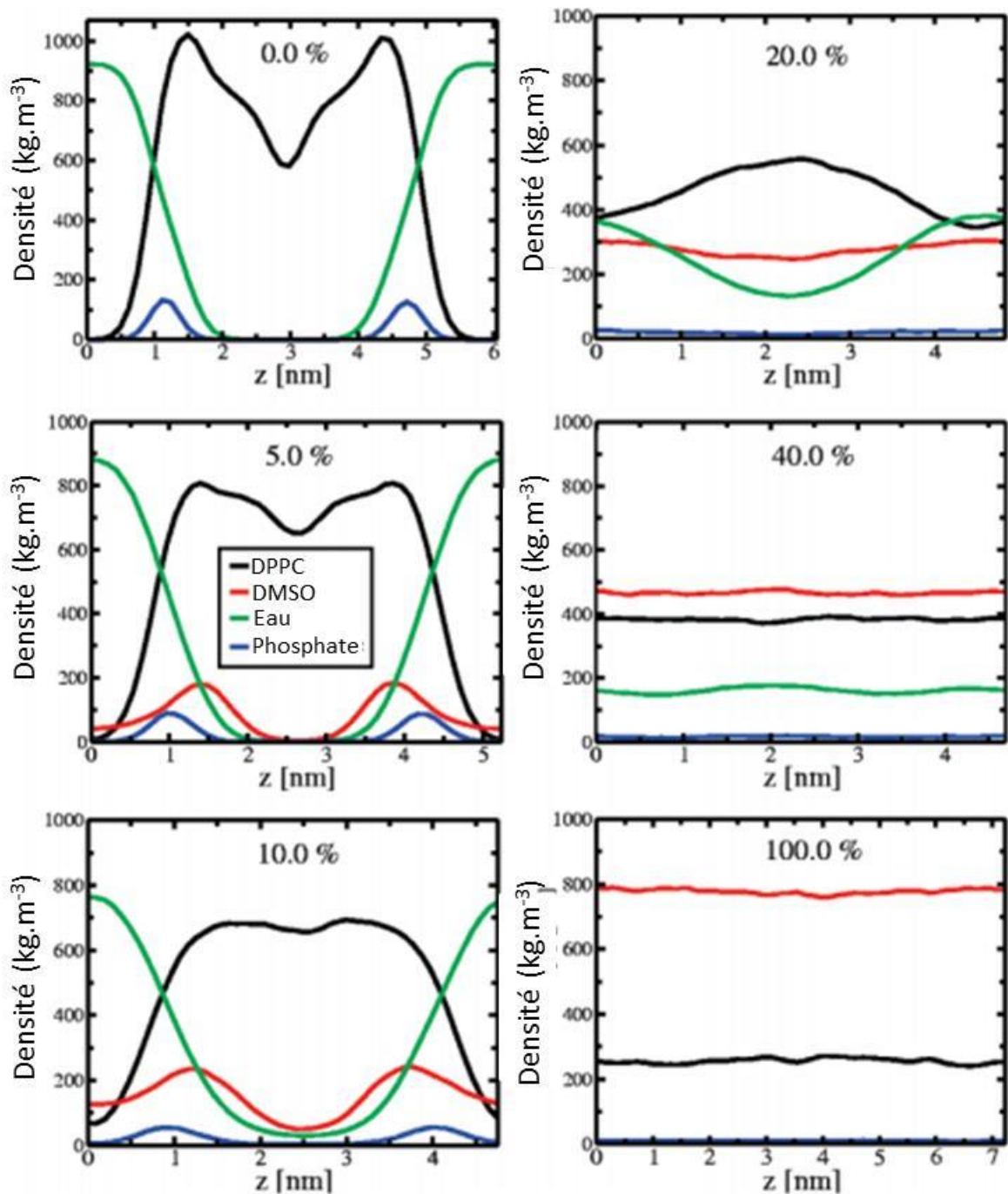


Figure 26 : Profils de densité du DMSO dans une bicouche lipidique de DPPC en présence de différentes concentrations de DMSO. Source : Gurtovenko et Anwar (2007)

### C. Perméabilisation par des agents physiques

Il existe différentes méthodes de perméabilisation par des agents physiques formant le domaine de la vectorologie physique permettant l'internalisation de médicaments ou d'acides nucléiques dans les cellules. Certaines méthodes ne concernent que le transfert d'acides

nucléiques (canon à ADN, injection hydrodynamique) alors que d'autres techniques permettent l'internalisation de molécules de différentes natures (micro-injection, sonoporation, électroporation et électroperméabilisation). Les techniques ne permettant que l'internalisation des acides nucléiques ne sont pas développées dans ce manuscrit.

La micro-injection consiste en l'injection de la substance d'intérêt dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule étudiée à l'aide d'une micropipette de verre. La sonoporation, l'électroporation et l'électroperméabilisation sont détaillées ci-dessous.

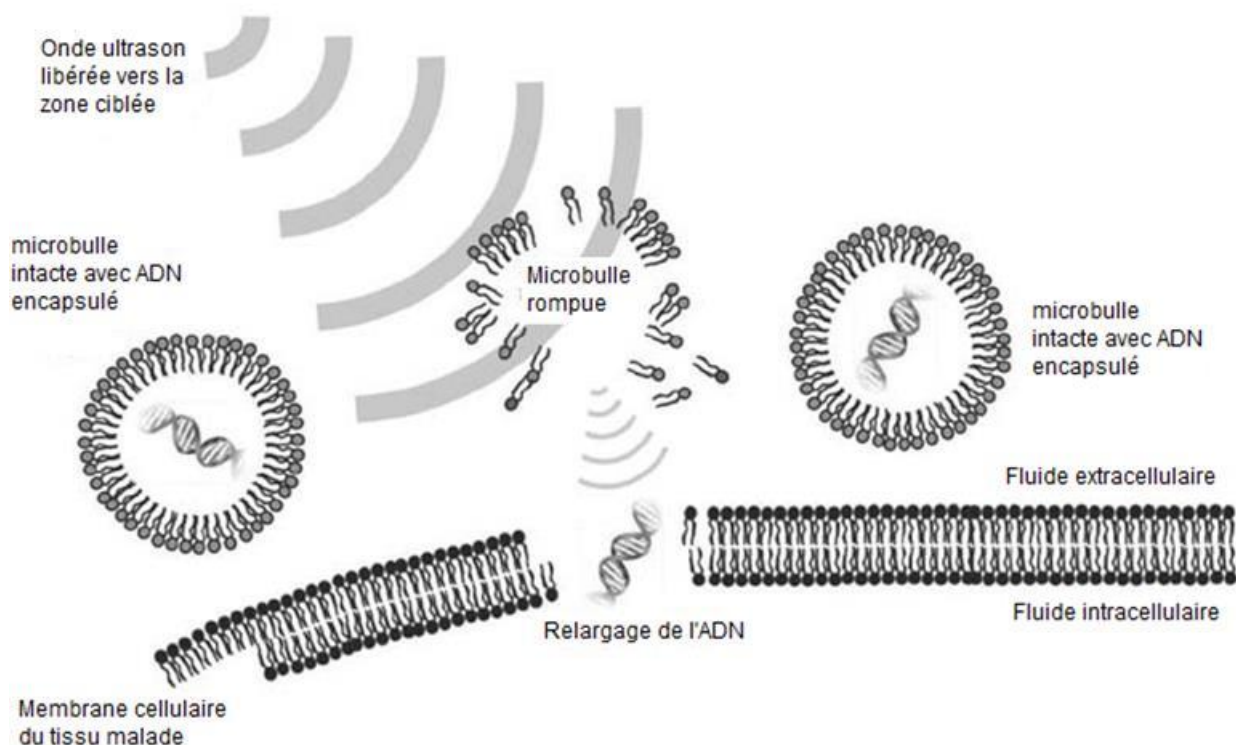
## 1) La sonoporation

La sonoporation utilise des ultrasons pendant quelques secondes à quelques dizaines de minutes à des fréquences comprises entre 0,5 et 4 MHz<sup>114</sup>. Cette technique a plus de vingt ans. Elle a d'abord été utilisée *in vitro* et elle est maintenant utilisée *in situ*. Les travaux de Fechheimer *et al.* (1987) ont permis de montrer que cette méthode était applicable à des lignées cellulaires humaines en culture<sup>115</sup>. Pendant une longue période, cette méthode a semblé peu efficace mais depuis quelques années, l'idée d'associer ces ondes sonores à des microbulles a permis de redonner un souffle nouveau à cette stratégie. En 2001, l'équipe de E. Unger a montré que la transfection de cellules du myocarde par des microbulles vecteurs d'ADN permet une internalisation efficace de gènes d'intérêt<sup>116</sup>. En effet, ces bulles vecteurs d'ADN éclatent à cause des pressions acoustiques variables des ultrasons ce qui permet la libération de l'ADN. Depuis, de nombreuses études ont été menées sur l'utilisation de la sonoporation associée à des microbulles de gaz comme l'Albunex®, l'Optison®, et le Levovist®<sup>117</sup> qui servent d'agents de contraste.

La théorie la plus probable est de penser que les pressions acoustiques permettent de faire éclater les microbulles par compressions et dilatations successives dues aux propriétés des ondes acoustiques. Si ces microbulles éclatent à proximité de la bicouche lipidique, il peut y avoir création de pores dans la membrane plasmique (Figure 27).

Grâce à l'utilisation des microbulles associées aux ultrasons, cette méthode montre un taux de transfection élevé. En effet, les ultrasons associés aux microbulles de type Optison® permettent d'atteindre un taux de transfection de plus de 74 % sur des fibres musculaires du muscle tibial antérieur de souris *in vivo*<sup>118</sup>.

La sonoporation en association avec des microbulles a aussi montré son efficacité pour délivrer *in vitro* de la bléomycine (un médicament anticancéreux) à des cellules tumorales. Cette technique permet de tuer jusqu'à 70% des cellules traitées. Cependant, il faut noter que 40% des cellules traitées ont été tuées grâce à la bléomycine (cela correspond donc à la perméabilisation réversible) et que les 30% supplémentaires de mortalité sont dus à la sonoporation en présence de microbulles (ces 30% de mortalité sont retrouvés sans la bléomycine et correspondent à la perméabilisation irréversible)<sup>119</sup>.



**Figure 27 : Principe de la sonoporation.** D'après Duvshani-Eshet et Machluf (2005) <sup>114</sup>

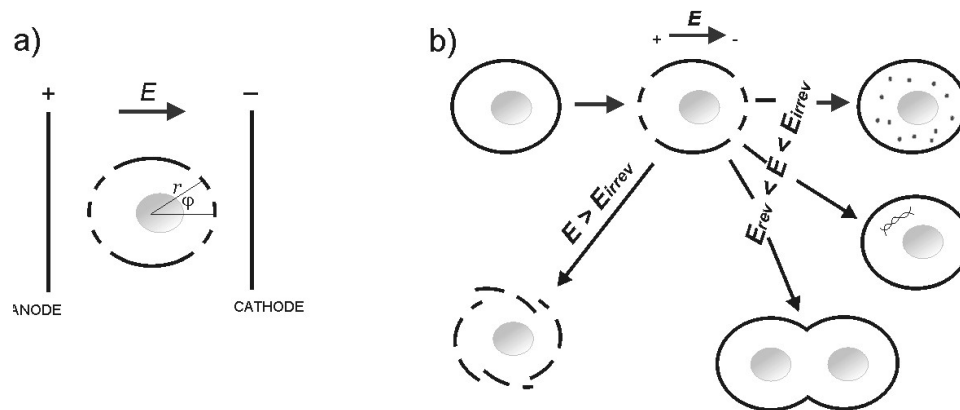
## 2) L'électroporation et de l'électroperméabilisation

### a) Principe

L'électroporation consiste en l'application d'impulsions de champ électrique sur les cellules pour augmenter la perméabilité membranaire. Ce concept a vu le jour au milieu des années 60 avec les travaux de Sale et Hamilton (1968) <sup>120</sup>. Au cours de leurs études sur des cultures cellulaires, les deux chercheurs ont montré que des molécules qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique dans des conditions normales peuvent être relarguées suite à l'utilisation d'un champ électrique. De plus, en 1982, Neumann *et al.* ont montré que le transfert de gène dans une cellule était possible par l'utilisation de champs électriques <sup>72</sup>. De nombreux travaux utilisant cette technologie ont suivi cette découverte.

Les cellules sont placées entre des électrodes sur lesquelles on applique un champ électrique. Si le champ électrique est suffisamment fort, il y a perméabilisation de la cellule avec un effet maximum au niveau des pôles de la membrane qui font face aux électrodes (Figure 28 a)). Selon l'amplitude et la durée du champ électrique et selon le nombre d'impulsions délivrées il est possible d'induire une perméabilisation réversible (entre une et huit impulsions, champ électrique compris entre quelques dizaines de  $\text{kV.m}^{-1}$  et moins de

200 kV.m<sup>-1</sup>, durée de l'ordre de 100 µs) ou irréversible (de quelques impulsions à quelques centaines d'impulsions, champ électrique compris entre 150 kV.m<sup>-1</sup> et 250 kV.m<sup>-1</sup> <sup>121, 122</sup> et durée de quelques dizaines de µs à quelques ms). L'électroporation réversible est utilisée pour faire entrer des molécules thérapeutiques (telles que des médicaments ou des acides nucléiques) mais aussi pour faire fusionner des cellules entre elles. L'électroporation irréversible est utilisée pour l'ablation de tumeurs *in vivo* et pour la stérilisation de liquides *in vitro*, par exemple.



**Figure 28 : Principes et applications de l'électroporation.** a) principe de l'électroporation et perméabilisation localisée. b) applications : perméabilisation réversible pour l'entrée de médicaments ou d'ADN, perméabilisation irréversible et fusion cellulaire. Source : Corovic et al. (2009) <sup>123</sup>.

## b) Les différentes impulsions électriques utilisées

### i. Les impulsions milliseconde

Les impulsions dites « milliseconde » sont utilisées soit pour perméabiliser la membrane plasmique soit pour déplacer les acides nucléiques (chargés négativement) dans la solution ou le tissu pour permettre une entrée de ces molécules dans les cellules. Ces impulsions sont aussi appelées impulsions LV (low voltage).

Dans plusieurs articles cherchant à perméabiliser la membrane plasmique de cellules animales <sup>124, 125</sup>, un train de 10 impulsions de 5 ms et d'amplitude de 10 à 90 kV.m<sup>-1</sup> a été appliqué. Dans les travaux de Coustets et al. (2013) visant à extraire les protéines contenues dans des microalgues, un train de 15 impulsions plus courtes (2 ms) mais de plus forte amplitude (300 kV.m<sup>-1</sup>) a été utilisé <sup>126</sup>. Dans ce cas, il y a électroporation irréversible. Par ailleurs, en 2012, Mauroy et al. ont utilisé 10 impulsions de 5 ms et d'amplitude 21-26 kV.m<sup>-1</sup> pour montrer que ces champs électriques peuvent déformer et altérer des vésicules géantes unilamellaires (ou Giant Unilamellar Vesicles –GUV- en anglais) en générant une perméabilisation et une perte de lipides <sup>127</sup>.

Les impulsions milliseconde peuvent aussi être utilisées pour générer une force électrophorétique permettant le mouvement de molécules chargées, telles que l'ADN, dans la solution ou dans le tissu traité. Ce type d'impulsion peut être délivré après l'application d'une impulsion de 100  $\mu\text{s}$  et de l'ordre de 100  $\text{kV.m}^{-1}$ , par exemple, visant à perméabiliser les membranes plasmiques des cellules. L'association de ces deux types d'impulsions électriques permet d'améliorer considérablement le taux de transfection lorsque des acides nucléiques sont utilisés et ce surtout *in vivo*.

#### *ii. Les impulsions microseconde*

Les impulsions dites « microseconde » utilisées le plus fréquemment sont des impulsions rectangulaires de durée de l'ordre de 100  $\mu\text{s}$  et de champ électrique de l'ordre de 100  $\text{kV.m}^{-1}$ . Elles sont souvent appelées impulsions HV (high voltage).

Il a été montré que des impulsions de 100  $\mu\text{s}$  (en général, une à huit impulsions délivrées à 1 Hz) et d'une amplitude d'environ 100  $\text{kV.m}^{-1}$  permettent de perméabiliser de nombreux types cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Ce type d'impulsions permet l'internalisation de nombreuses molécules telles que le LY<sup>59, 128</sup>, la bléomycine<sup>68, 129</sup>, *in vitro* ou le (51)Chrom- Acide Ethylènediaminetétraacétique (51)Cr-EDTA<sup>130, 131</sup> ou une séquence d'ADN plasmidique (en association avec une ou des impulsions milliseconde pour créer une force électrophorétique)<sup>132, 133</sup> *in vivo*.

Ce type d'impulsions peut donc être utilisé pour entraîner l'électroperméabilisation de la membrane cellulaire permettant de faire entrer des acides nucléiques ou des médicaments mais ces impulsions peuvent aussi être utilisées pour réaliser la fusion de cellules en contact ou même pour rompre l'intégrité membranaire des cellules et entraîner une mort cellulaire dans le cas de l'électroperméabilisation irréversible (Cf. II.D.).

#### *iii. Les impulsions nanoseconde*

Les impulsions dites « nanoseconde » sont étudiées depuis une dizaine d'années. Ces impulsions de quelques nanosecondes à quelques centaines de nanosecondes ont la particularité de pouvoir affecter les membranes des organites intracellulaires en plus de la membrane plasmique (Cf. III. A. 3)

#### **c) Combinaison et comparaison des impulsions HV et LV et optimisation**

Certaines études utilisent une combinaison d'impulsions HV et LV. Les travaux de Satkauskas *et al.* (2002) ont montré l'importance des impulsions LV dans la combinaison d'impulsions LV et HV pour l'entrée de l'ADN dans le muscle<sup>131</sup>. Une première impulsion de 100  $\mu\text{s}$  et de « High Voltage » (HV) est appliquée dans un premier temps ce qui permet de perméabiliser les cellules musculaires puis l'application d'une ou de quatre impulsions LV

permet d'augmenter le niveau de transfection même si cette dernière impulsion est appliquée jusqu'à 50 min après l'impulsion HV.

Une étude de Cemazar *et al.* a comparé l'efficacité de transfection *in vivo* d'un protocole utilisant des impulsions milliseconde avec le protocole classique d'électrotransfert de gènes utilisant des impulsions microseconde. Ils ont utilisé huit impulsions de  $60 \text{ kV.m}^{-1}$  et de 5 ms pour les impulsions milliseconde et huit impulsions HV de  $100 \mu\text{s}$  de  $60$  à  $140 \text{ kV.m}^{-1}$  suivies de une à huit impulsions LV de  $8$  à  $16 \text{ kV.m}^{-1}$  et de durée  $50$  à  $400 \text{ ms}$  pour le protocole utilisant les impulsions microseconde. Le résultat de cette étude est que ces deux protocoles, lorsqu'ils sont optimisés, permettent d'obtenir des niveaux d'expression similaires

<sup>134</sup>.

Cependant, André *et al.* ont montré à la même époque qu'en optimisant la durée du laps de temps entre les impulsions HV et les impulsions LV (paramètre qui n'avait pas été optimisé dans l'étude de Cemazar *et al.*) il est possible d'obtenir une efficacité de transfection bien supérieure à celle mesurée pour une série de huit impulsions milliseconde <sup>133</sup>.

Par ailleurs, les travaux de Hojman *et al.* expliquent que l'association d'une impulsion HV avec une impulsion LV permet de limiter les dommages faits au tissu et permet une perméabilisation satisfaisante mais inférieure à celle induite par huit HV de  $20 \text{ ms}$  et de  $24 \text{ kV.m}^{-1}$  ou par huit HV de  $100 \mu\text{s}$  et de  $100 \text{ kV.m}^{-1}$ . La combinaison d'une impulsion HV avec une impulsion LV est donc plus sûre car elle est moins toxique. Cependant, l'expression du plasmide électrotransfecté n'était pas le but de cet article mais ce facteur pourrait aussi être pris en compte lors de l'optimisation de la méthode en vue d'une utilisation donnée <sup>135</sup>. L'efficacité de transfection de différentes combinaisons d'impulsions a été évaluée dans l'article d'André *et al.* (2008) sur le même modèle (une partie des auteurs est communes aux deux articles) sur différents modèles (muscle squelettique, tumeur, foie, peau) <sup>133</sup>. Les combinaisons d'une impulsion HV suivie d'une ou de plusieurs impulsions LV (délivrées à une fréquence de  $1 \text{ Hz}$ ) séparées ou non par un délai de  $1 \text{ s}$  (entre les impulsions HV et LV) ont été comparées à la combinaison de huit impulsions LV de  $20 \text{ ms}$  délivrées à  $1 \text{ Hz}$ . L'expression de la luciférase est 10 fois plus importante, dans le muscle squelettique, lorsque la combinaison d'une impulsion HV de  $100 \mu\text{s}$  et de  $60$  ou  $80 \text{ kV.m}^{-1}$  suivie par une impulsion LV de  $400 \text{ ms}$  et de  $8 \text{ kV.m}^{-1}$  appliquée après un délai de  $1 \text{ s}$  est utilisée par comparaison à la combinaison de huit impulsions LV de  $20 \text{ ms}$  et de  $20 \text{ kV.m}^{-1}$  ( $1 \text{ Hz}$ ). Lorsque le délai de  $1 \text{ s}$  entre l'impulsion HV et l'impulsion LV n'est pas utilisé, l'efficacité de la transfection est comparable avec celle utilisant un train huit impulsions LV de  $20 \text{ ms}$ . Le délai de  $1 \text{ s}$  entre les deux impulsions est donc très important dans cette expérience. Ce délai est aussi important lorsque ces impulsions sont appliquées à la peau. Cependant, l'ajout d'un délai de  $1 \text{ s}$  entre les impulsions HV et LV n'améliore pas la transfection lorsqu'un modèle de tumeur est utilisé (B16, mélanomes de souris). Pour le foie,

une autre combinaison a été utilisée. Une impulsion HV de  $55 \text{ kV.m}^{-1}$  a été suivie par huit impulsions LV de 400 ms et de  $8 \text{ kV.m}^{-1}$ . Il n'y a pas non plus d'amélioration de l'électrotransfert du foie en utilisant 1 s de délai entre l'impulsion HV et les impulsions LV. Dans ce cas-ci, l'ajout de l'impulsion HV avant les huit impulsions LV présente la même efficacité que lorsque seuls huit LV sont délivrés. Par contre cette combinaison (comprenant le délai de 1 s ou non) est plus efficace que la combinaison composée de huit impulsions LV de 20 ms et de  $25 \text{ kV.m}^{-1}$  délivrée à 1 Hz. Il y a donc des facteurs spécifiques aux tissus qui jouent un rôle important dans l'efficacité respective des impulsions HV et LV.

En conclusion, dans les deux cas il faut des impulsions milliseconde pour créer la force électrophorétique permettant le déplacement de l'ADN dans le tissu. Cette force électrophorétique n'est pas essentielle dans le cas d'études *in vitro*.

### 3) Les mécanismes de l'électroporation et de l'électroperméabilisation

A l'état de repos de la cellule, la membrane plasmique se comporte comme un isolant d'un point de vue électrique. Cependant, certains ions, comme principalement l'ion  $\text{K}^+$ , sont continuellement mis en mouvement par les pompes ATPase  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ce qui entraîne un déséquilibre ionique de part et d'autre de la membrane. C'est ce qui crée la différence de potentiel de repos ou potentiel dit de membrane (Cf. I.A.5)

Lorsque les cellules sont soumises aux champs électriques décrits ci-dessus (impulsions milliseconde, microseconde ou nanoseconde), les charges mobiles (principalement les ions) vont se déplacer sous l'action de la force électrophorétique induite par le champ électrique, ce qui va avoir pour conséquence de charger la membrane. Lorsque la différence de potentiel induite atteint une valeur critique, appelée seuil de perméabilisation, les propriétés de la membrane changent et la membrane perd son caractère isolant. La membrane plasmique devient donc plus perméable à l'eau, aux ions et aux molécules de taille moyenne (marqueurs de perméabilisation, certains médicaments, plasmides, ADN, ...). Dans le cas d'une électroperméabilisation réversible, cette augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ne dure que de quelques minutes à quelques dizaines de minutes puis la membrane revient à son état d'origine.

Dans le cas des impulsions millisecondes et microsecondes, la durée des impulsions est plus longue que le temps de charge de la membrane donc la membrane a le temps d'être chargée jusqu'à atteindre le régime statique. Même si la durée des impulsions est plus courte que le temps de charge de la membrane il a été montré par des marqueurs fluorescents sensibles à la différence de potentiel que la membrane plasmique se charge

pendant l'application d'impulsions de 100 ns et de 9,5 mV.m<sup>-1</sup> <sup>136</sup>. De plus, il a été montré par la méthode du patch-clamp que la conductivité de la membrane plasmique était modifiée par l'application d'impulsions nanoseconde de 60 ns <sup>137</sup>. Cette observation est aussi faite lors de l'application d'impulsions microseconde ou milliseconde. Il semblerait donc que la différence de potentiel générée par les impulsions nanosecondes ne puisse pas atteindre le régime statique mais que sa variation soit suffisante pour atteindre le seuil de perméabilisation (à relier avec la grande amplitude des champs électriques utilisés pour les impulsions nanosecondes).

#### a) La modification de la différence de potentiel transmembranaire

La différence de potentiel transmembranaire de repos,  $\Delta\psi_0$ , est comprise -20 mV et -200 mV selon l'espèce et le type cellulaire <sup>30</sup>. A ce potentiel de repos s'ajoute la variation du potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi_i$ ) induite lorsqu'une cellule possédant une membrane homogène est soumise à l'application d'un champ électrique uniforme. Ce phénomène peut-être décrit, en première approximation, par l'équation (1) déterminée par la résolution de l'équation de Laplace <sup>138</sup> :

$$\Delta\psi_i = f E r \cos(\theta) [1 - \exp(\frac{-t}{\tau_m})] \quad (1)$$

Où E est l'amplitude du champ électrique, r est le rayon de la cellule,  $\theta$  est l'angle mesuré entre la normale à la position sur la membrane de la cellule et la direction du champ électrique et f est une fonction dépendant des propriétés géométriques et physiques de la cellule définie par l'équation (2) <sup>139</sup> :

$$f = \frac{3\lambda_0 [3dr^2\lambda_i + (3d^2r - d^3)(\lambda_m - \lambda_i)]}{2r^3 (\lambda_m + 2\lambda_0) \left(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i\right) - 2(r-d)^3(\lambda_0 - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)} \quad (2)$$

et  $\tau_m$  est la constante caractéristique de temps de la membrane définie par l'équation (3) <sup>138</sup>:

$$\tau_m = \frac{rC_m}{\frac{2\lambda_0\lambda_i}{2\lambda_0 + \lambda_i} + \frac{r}{d}\lambda_m} \quad (3)$$

où d est l'épaisseur de la membrane,  $\lambda_i$  est la conductivité du cytoplasme,  $\lambda_m$  est la conductivité de la membrane,  $\lambda_0$  est la conductivité du milieu extracellulaire et  $C_m$  est la capacitance de la membrane.

Si l'on fait l'approximation de considérer la membrane comme un isolant parfait, on obtient :

$$\lambda_m = 0 \Rightarrow f \sim \frac{3}{2}$$



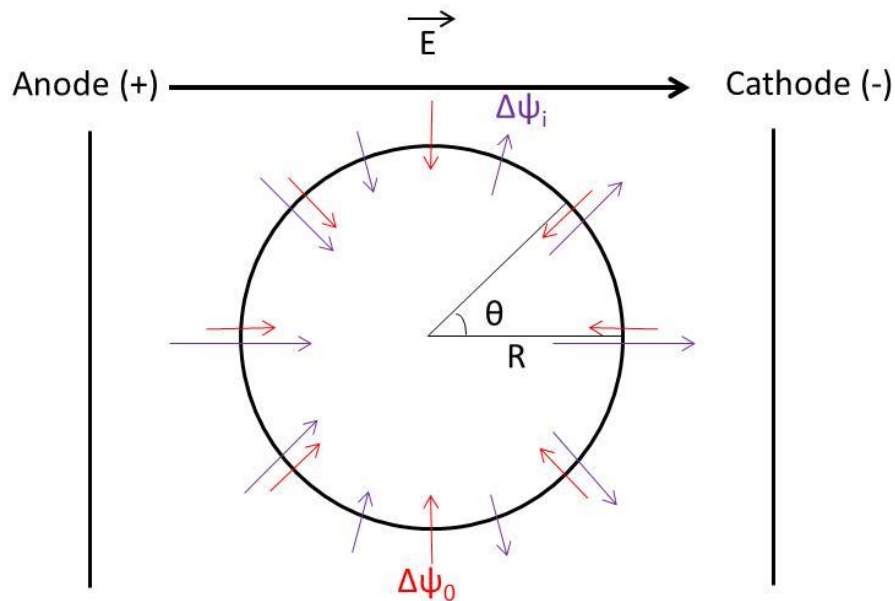
De plus, dans le cas des impulsions milliseconde et microseconde, il est supposé que la durée de l'impulsion est bien supérieure à la constante caractéristique de temps de la membrane donc :

$$t \gg \tau_m \Rightarrow [1 - \exp(-\frac{t}{\tau_m})] \rightarrow 1$$

ce qui permet de simplifier l'équation (1) en l'équation de Schwann (4)<sup>140</sup> :

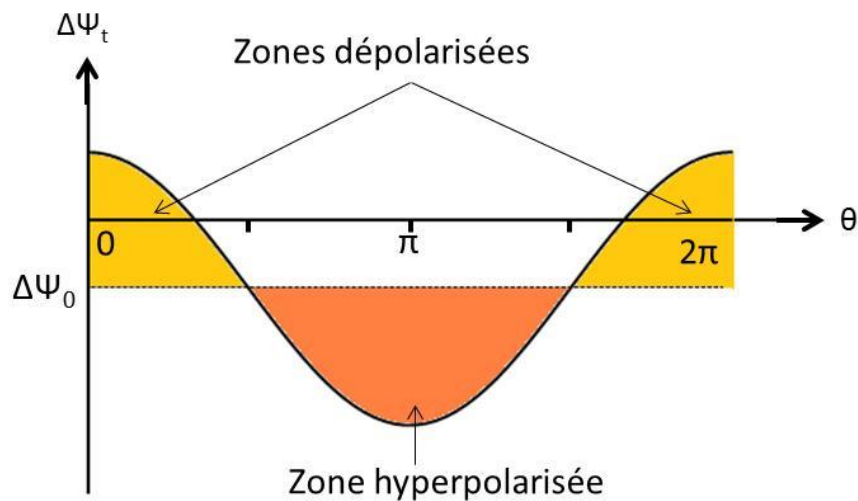
$$\Delta\psi_i = \frac{3}{2} E R \cos(\theta) \quad (4)$$

La valeur de  $\Delta\psi_i$  en un point de la membrane est donc dépendante de la position de ce point sur la membrane comme le montre la Figure 29 .



**Figure 29 : Représentation des variations de la différence de potentiel transmembranaire induit par l'application d'un champ électrique uniforme sur une cellule de rayon  $r$ .** Les flèches rouges représentent le potentiel de repos et les flèches violettes représentent le potentiel transmembranaire induit.

Les valeurs de  $\Delta\psi_i$  les plus grandes sont retrouvées au niveau des pôles de la cellule faisant face aux électrodes. Le pôle de la cellule face à l'anode est hyperpolarisé alors que celui face à la cathode est dépolarisé. Il est possible de tracer une courbe des potentiels totaux  $\Delta\psi_t$  (somme de  $\Delta\psi_i$  et de  $\Delta\psi_0$ ) en fonction de la position sur la membrane (Figure 30)

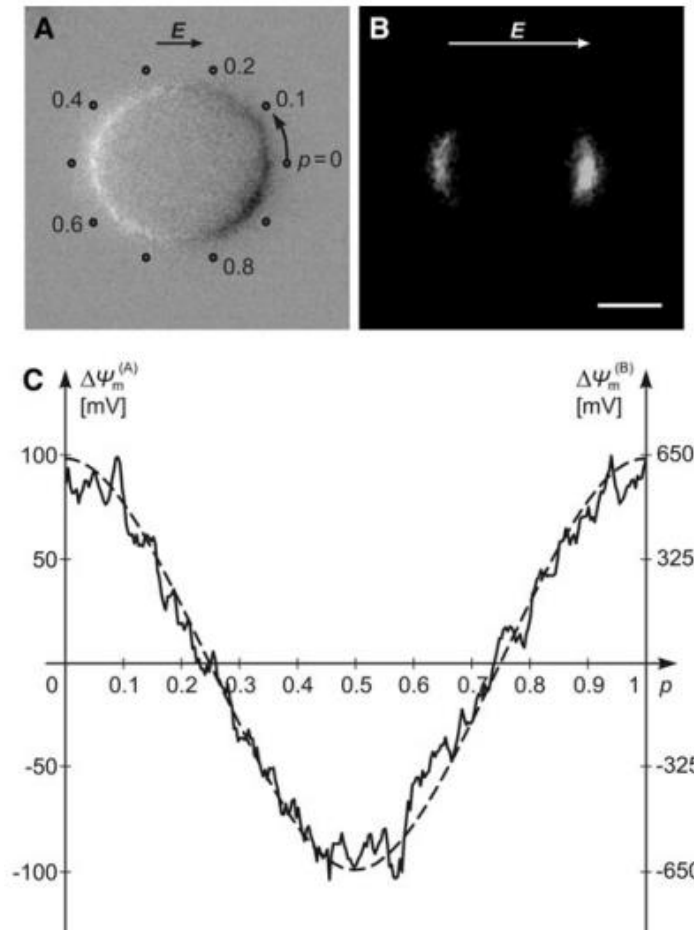


**Figure 30 : Représentation schématique de la différence de potentiel totale en fonction de  $\theta$  pour une cellule sphérique.**

Il est donc possible de prédire les zones de la membrane où la perméabilisation sera la plus importante.

Cette théorie a été vérifiée par plusieurs expériences comme le montrent les travaux de Kinoshita *et al.* (1988)<sup>141</sup> ou ceux de Kotnik *et al.* (2010)<sup>142</sup>. Comme le montrent les travaux de Kotnik *et al.*, il est possible d'observer les variations du  $\Delta\Psi_i$  grâce à des marqueurs fluorescents sensibles aux potentiels transmembranaires tels que le di-8-ANEPPS tout en suivant en parallèle l'entrée d'un marqueur de perméabilisation tel que l'IP pour vérifier cette théorie. Ces travaux prouvent que le modèle est totalement en accord avec la réalité (Figure 31). Sur cette figure, la variation du potentiel transmembranaire entre deux temps est représentée (avant l'exposition et pendant l'exposition au champ électrique). Le potentiel de repos n'est donc pas pris en compte dans cette représentation.

En effet, les zones les plus affectées sont bien les pôles de la cellule faisant face aux électrodes avec un effet maximal au niveau du pôle de la cellule située face à l'anode.



**Figure 31 : Visualisation des variations locales de potentiel membranaire sur une cellule sphérique d'ovaire de hamster chinois (Chinese Hamster Ovary cells, CHO).** A. changements de la fluorescence du di-8-ANEPPS causés par une impulsion électrique non perméabilisante de 50 ms, 10 kV.m<sup>-1</sup>. B. transport d'IP (dans la même cellule) causé par une impulsion électrique perméabilisante de 1,5 ms, 65 kV.m<sup>-1</sup> visualisé 200 ms après l'exposition. La barre fait 5 μm. C. la courbe pleine représente les valeurs du potentiel membranaire mesurées le long de la membrane plasmique de la cellule en A (comme indiqué sur la figure A) et la courbe en pointillés représente le modèle prédit par l'équation (4). A noter : dans le panneau B, de toute évidence, il y a eu une inversion de la direction de la flèche qui représente le champ électrique appliqué à cette cellule puisque c'est toujours le pôle faisant face à l'anode qui est le plus perméabilisé dans une cellule animale. Source : Kotnik *et al.* (2010) <sup>142</sup>.

#### b) Le seuil de perméabilisation et la rupture de la membrane

Pour qu'il y ait rupture de la membrane, il faut que le  $\Delta\psi_i$  atteigne le seuil de perméabilisation  $\Delta\psi_s$ . Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur une cellule, il induit une variation du potentiel transmembranaire qui vient s'ajouter au potentiel transmembranaire de repos de la cellule. La notion de seuil de perméabilisation  $\Delta\psi_s$ , qui implique d'atteindre un champ électrique externe seuil  $E_s$ , a été introduite par Neumann et Rosenheck (1972) <sup>143</sup>. Le seuil de perméabilisation dépend, entre autres, de la taille et de la conformation du marqueur utilisé pour observer cette perméabilisation.

### *i. Influence de l'intensité du champ électrique*

En 1990, il a été montré par Rols et Teissié que l'étendue de la perméabilisation est directement dépendante de l'amplitude du champ électrique appliqué sur les cellules alors que le nombre d'impulsions et la durée de ces impulsions influence l'intensité du flux de molécules pouvant traverser la membrane perméabilisée <sup>144</sup>.

Par ailleurs, il existe différentes hypothèses expliquant la rupture de la membrane. Si la bicouche lipidique est considérée comme un fluide homogène, cette rupture pourrait être due aux forces de compression qui s'appliquent de part et d'autre de la membrane. Lorsque ces forces ne sont plus compensées par les forces viscoélastiques du fluide homogène, auquel est assimilée la membrane, cela entraîne une cassure qui rend la membrane perméable <sup>145</sup>, <sup>146</sup>. La rupture de la membrane pourrait aussi être due à la présence de défauts sur la membrane plasmique qui grandissent sous l'action du champ électrique <sup>147</sup>. Cependant, ces différents modèles ne permettent pas d'expliquer l'effet de plusieurs impulsions ou l'effet d'impulsions plus ou moins longues sur une membrane. L'entrée de marqueurs de perméabilisation dépend aussi du nombre d'impulsions et de la durée de ces impulsions puisque ces paramètres influencent l'intensité des flux de molécules traversant la membrane, ce qui ne peut pas être prédit par ces modèles. De plus, ces modèles ne permettent pas non plus de prédire l'effet produit par l'augmentation du champ au-dessus du seuil de perméabilisation. En effet, lorsque le champ atteint une valeur seuil, le début de la perméabilisation est observé. Si des impulsions d'amplitude de champ supérieure sont appliquées, dans un premier temps, une augmentation de la proportion des cellules perméabilisée est visible. Ceci est vrai jusqu'à une certaine valeur de champ puis pour des valeurs plus importantes une augmentation de la mortalité (donc de la perméabilisation irréversible) se produit.

Cependant, il faut noter que la valeur du champ électrique  $E_{\text{seuil}}$  qui doit être appliquée pour permettre la perméabilisation d'une cellule donnée dépend aussi fortement du marqueur de perméabilisation et de la sensibilité de la technique de détection utilisée.

### *ii. Influence de la taille et de la géométrie des objets perméabilisés*

D'après l'équation (4), l'amplitude du champ électrique nécessaire à la perméabilisation est dépendante du rayon de la cellule électroporée. Plus le rayon de la cellule est grand, plus l'amplitude du champ électrique nécessaire pour atteindre le seuil de perméabilisation est faible. Rols et Teissié ont comparé les champs nécessaires pour perméabiliser des cellules CHO (diamètre  $\sim 15 \mu\text{m}$ ) et des érythrocytes (diamètre  $\sim 7 \mu\text{m}$ ) et ont trouvé qu'il fallait un champ deux fois plus faible pour perméabiliser les cellules CHO par rapport aux érythrocytes <sup>70</sup>. Cependant, les marqueurs utilisés pour visualiser la perméabilisation de ces deux types

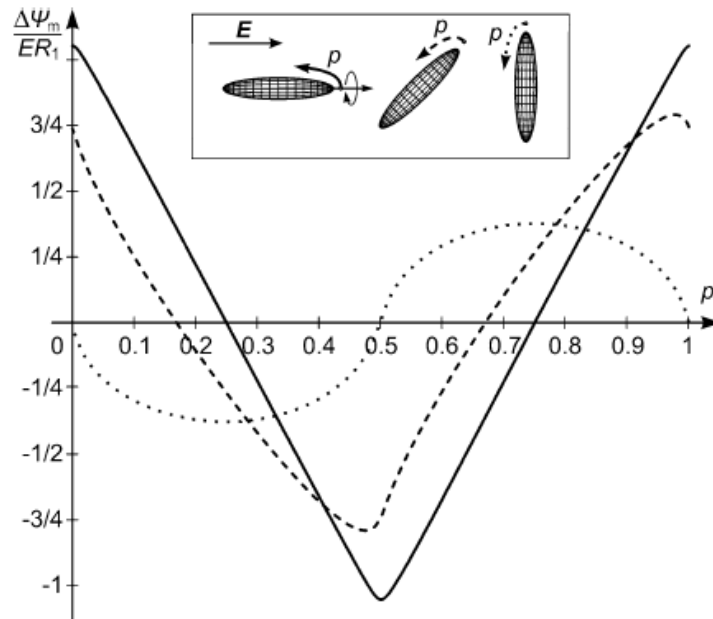
de cellules n'étaient pas les mêmes. La perméabilisation des cellules CHO a été suivie par l'entrée de bleu de Trypan, de poids moléculaire  $965 \text{ g/mol}^{-1}$ , alors que celle des érythrocytes a été suivie en mesurant le relargage d'hémoglobine, de poids moléculaire de  $68\,000 \text{ g/mol}^{-1}$ . Même si ces résultats sont cohérents avec la théorie, ils doivent être nuancés car plus les molécules suivies sont grosses plus le niveau de perméabilisation permettant leur passage à travers la membrane doit être important (cf. II. A. 3). Cependant, la sensibilité de la méthode de détection du marqueur entre en cause dans la détection de la perméabilisation et peut compenser les différences observées au niveau des tailles de marqueurs utilisés.

Par ailleurs, l'effet de la taille est confirmé par le fait que les bactéries qui ont une taille inférieure aux cellules animales ou végétales (environ  $1$  à  $3 \mu\text{m}$  pour les bactéries contre environ  $10$  à  $100 \mu\text{m}$  pour les cellules animales et végétales) nécessitent des champs électriques supérieurs pour être perméabilisées de manière réversible ou irréversible. En effet, la plupart des cellules animales et végétales en suspension sont perméabilisées irréversiblement pour un champ électrique autour de  $150 - 250 \text{ kV.m}^{-1}$  <sup>121, 122</sup> alors que les bactéries doivent être soumises à des impulsions de plus forte amplitude (de l'ordre de  $1 \text{ MV.m}^{-1}$ ). Les travaux de Goldberg *et al.* rapportent que 53% des *E. coli* présents dans une solution à décontaminer et dont la taille est comprise entre  $0,5$  et  $3 \mu\text{m}$  survivent à 20 impulsions de  $100 \mu\text{s}$  et de  $540 \text{ kV/m}^{-1}$  (délivrées à  $1 \text{ Hz}$ ). Cependant, seulement 0,37% de ces bactéries survivent à 20 impulsions identiques mais de  $1 \text{ MV.m}^{-1}$  <sup>148</sup>.

Une autre preuve de l'implication de la géométrie et de la taille des objets à électroperméabiliser est donnée dans un article de Rols et Teissié de 1990. Ils ont montré que les mêmes cellules CHO ne nécessitent pas le même champ électrique pour être perméabilisées lorsqu'elles sont en suspension et rondes ou lorsqu'elles sont adhérentes et étalées. En effet, en suspension il faut appliquer un champ de  $70 \text{ kV.m}^{-1}$  pour visualiser l'entrée du marqueur de perméabilisation choisi, le bleu de trypan, alors que  $30 \text{ kV.m}^{-1}$  sont suffisants pour perméabiliser ces mêmes cellules lorsqu'elles sont étalées en tapis cellulaire

<sup>144</sup>.

Kotnik *et al.* (2010) ont aussi montré théoriquement que la géométrie ainsi que l'orientation des cellules par rapport à l'orientation du champ étaient des paramètres très importants. En effet, les valeurs maximales du potentiel transmembranaire induit dépendent de ces paramètres comme présenté dans la Figure 32.

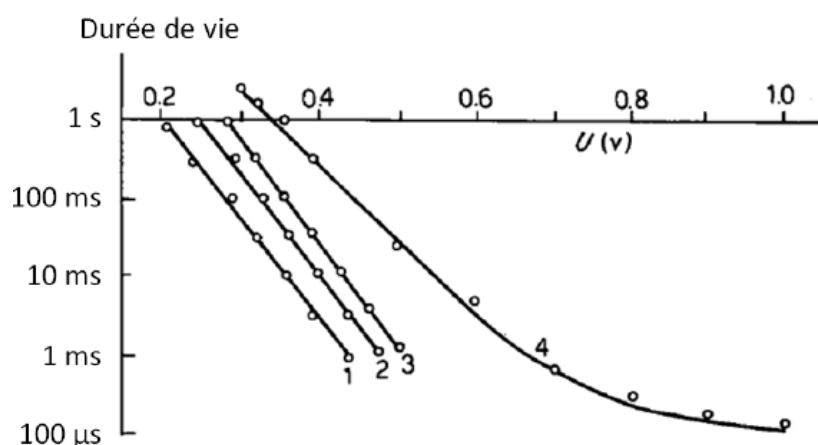


**Figure 32 : Simulation des variations du potentiel transmembranaire induit normalisées par rapport à la taille des cellules et à la force du champ électrique appliqué.** Le champ est appliqué à des cellules sphéroïdales avec  $R_2 = 5 \times R_1$  ( $R_2$  est le grand axe de l'objet étudié et  $R_1$  est le petit axe) correspondant et avec l'axe de rotation aligné avec le champ (ligne pleine), orienté à  $45^\circ$  par rapport au champ (ligne hachée) ou orienté perpendiculairement au champ (ligne pointillée). Source : Kotnik *et al.* (2010)<sup>142</sup>

En effet, la cellule dont l'axe de rotation est aligné avec le champ est celle qui présente les extrêmes maximaux de potentiel transmembranaire induits alors que la cellule perpendiculaire au champ présente les potentiels les plus faibles. Enfin, cette étude montre aussi que la forme des courbes dépend de l'orientation des cellules<sup>142</sup>.

### iii. Influence de la durée des impulsions appliquées

Il a été observé que la création de pores était possible dans des membranes comprenant des protéines (comme les membranes plasmiques des cellules) mais aussi dans des bicouches purement constituées de lipides (comme les GUV)<sup>127</sup>. L'étude d'Abidor *et al.* (1979) a été réalisée sur des bicouches purement lipidiques et a montré que la durée des impulsions influe aussi sur la tension pour laquelle on observe une rupture de la membrane comme montré sur la Figure 33. Plus la durée des impulsions est longue, plus les seuils de perméabilisation observés sont faibles.

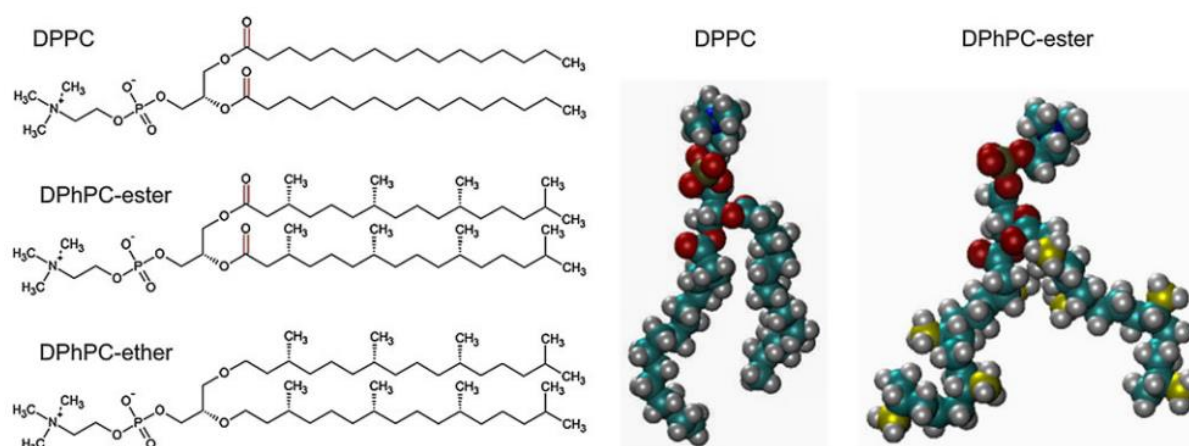


**Figure 33 : Relation entre la durée de vie moyenne d'une bicouche lipidique artificielle en fonction de la tension à ces bornes pour différents lipides.** 1. lécithine. 2. lécithine synthétique avec des chaines carbonées stéarine. 3. cholestérol et lécithine. 4. lipides généraux. D'après Abidor *et al.* (1979)<sup>147</sup>.

En effet, la création d'un pore sous l'action d'un champ électrique est un phénomène stochastique donc plus le temps pendant lequel l'impulsion est appliquée est important, plus la probabilité d'observer un pore se former est importante.

#### iv. Influence des lipides composant la bicouche lipidique

Polak *et al.* ont montré, en 2013, que le seuil de perméabilisation dépendait aussi de la composition de la bicouche lipidique et des propriétés physico-chimiques des lipides étudiés. Ces travaux ont été réalisés en dynamique moléculaire (DM) sur trois lipides différents : le DPPC, le diphytanoyl-phosphocholine-ester (DPhPC-ester) et le diphytanoyl-phosphocholine-éther (DPhPC-éther) présentés Figure 34. Ce choix a été fait pour étudier l'impact sur le seuil de perméabilisation des groupements méthyl sur les chaines carbonées de ces archéolipides ainsi que des liaisons éthers qu'ils possèdent.



**Figure 34 : Structure des lipides étudiés dans les travaux de Polak *et al.* (2013).** A droite, les atomes sont représentés selon le code couleur (O : rouge, C : cyan et jaune, H : gris, N : bleu, P : marron)<sup>149</sup>.

La perméabilisation est suivie, *in silico* (DM), par l'apparition d'un pore dans la portion de membrane étudiée. Le DPPC est perméabilisé pour un potentiel transmembranaire plus faible (2,3 V) que le DPhPC-ester (3 V) qui lui-même est perméabilisé pour un potentiel plus faible que le DPhPC-éther (3,7 V). Cependant, ces valeurs de perméabilisation semblent supérieures à celles observées couramment (Cf. II. C. 4. v.) même pour le DPPC qui est un phospholipide classique retrouvé chez les eucaryotes. Les archéolipides sont des lipides très stables qui résistent à des conditions extrêmes et il semblerait que les propriétés physico-chimiques de ces lipides permettent d'augmenter le potentiel transmembranaire que les bicouches lipidiques faites avec ces lipides peuvent supporter. Cela a donc pour conséquence directe d'augmenter le seuil d'électroperméabilisation.

#### v. Valeurs de seuils de perméabilisation

En 1975, Coster et Zimmermann ont mesuré le seuil de perméabilisation de cellules de *Valonia utricularis* (une algue verte géante) par des méthodes électriques. Ils ont observé que le seuil de perméabilisation était dépendant de la température puisqu'à 4°C 1000 mV sont nécessaires pour observer une rupture de la membrane alors qu'à 30°C, seulement 640 mV sont nécessaires<sup>150</sup>. Il faut noter que, dans ces expériences, une des électrodes est insérée dans la vacuole et l'autre à l'extérieur de la cellule. L'impulsion électrique traverse donc la paroi, la membrane plasmique et la membrane de la vacuole (tonoplaste). Même si la paroi peut être considérée comme transparente pour la propagation de l'impulsion, la configuration est différente de celle des cellules animales étudiées en patch clamp où seule la membrane plasmique est traversée. De plus, Hibino *et al.* (1993) ont montré que le seuil de perméabilisation était d'environ 1 V pour des œufs d'oursins. Cette valeur a été obtenue en utilisant une sonde fluorescente dont l'intensité de fluorescence dépend du potentiel transmembranaire<sup>151</sup>.

Teissié et Tsong (1981) ont travaillé sur un modèle de vésicules lipidiques de 100 nm de diamètre en observant la fuite de saccharose (342 g.mol<sup>-1</sup>) comme indicateur de la perméabilisation et ont montré que le seuil de perméabilisation est atteint lorsque le potentiel transmembranaire atteint environ 200-300 mV<sup>152</sup>. Teissié et Rols ont également évalué expérimentalement le seuil de perméabilisation des cellules CHO en suivant l'entrée de bleu trypan (965 g.mol<sup>-1</sup>). D'après leurs résultats, ces cellules sont perméabilisées lorsque leur potentiel transmembranaire atteint environ 250 mV<sup>153</sup>. De plus, dans cet article ils ont évalué par le calcul le potentiel transmembranaire atteint dans d'autres travaux publiés par leur équipe au préalable et ont montré que des protoplastes de bactéries et de cellules végétales sont perméabilisés quand leur potentiel transmembranaire atteint des valeurs comprises entre 100 et 250 mV.



En 2011, Wegner *et al.* ont utilisé la technique du patch-clamp sur cellule entière pour montrer que les protoplastes végétaux dérivées de cultures de tabac étaient perméabilisés pour des hyperpolarisations du potentiel transmembranaire de -250 mV à -300 mV et des dépolarisations de +200 à +250 mV <sup>154</sup>. Dans le même article, ils ont aussi montré que pour une algue marine géante (*Valonia utricularis*), il faut atteindre +800 mV pour observer une perméabilisation. Comme dans les travaux de Coster et Zimmermann (1975), présentés plus haut, les électrodes étaient séparées par la membrane plasmique et le tonoplaste (ici la paroi a été retirée). Dans cette étude, le champ appliqué grâce au patch-clamp est un champ homogène sur toute la cellule et la perméabilisation est visualisée en suivant la baisse de la conductance de la membrane qui est un moyen indirect de suivre le passage des ions à travers la membrane.

En résumé, les valeurs de seuils de potentiels transmembranaires rapportées dans la littérature varient donc entre 100 mV et 1 V.

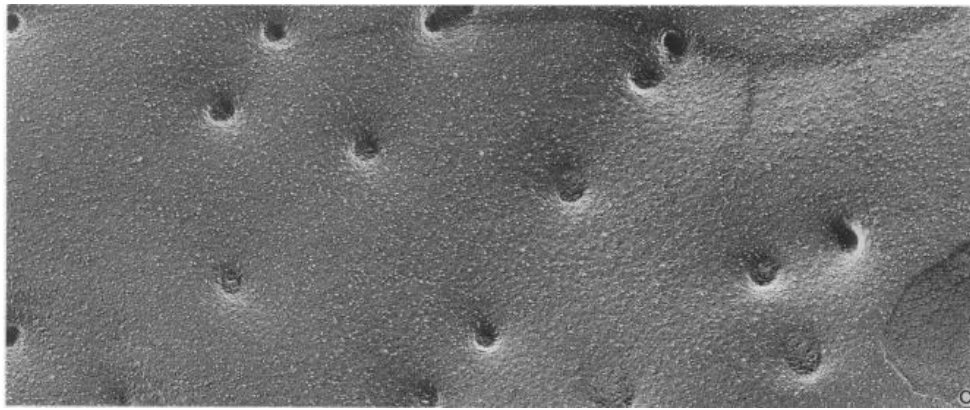
### c) L'état perméabilisé de la membrane

#### *i. Influence de l'augmentation du champ électrique au-dessus du seuil de perméabilisation*

Lorsque le seuil de perméabilisation est atteint, la cellule est dans un état dit perméabilisé. Si l'amplitude du champ électrique est augmentée au-dessus du champ nécessaire à la perméabilisation de la cellule, Rols et Teissié ont montré en 1990 que cela avait pour conséquence d'augmenter la surface de la zone perméabilisée de la cellule <sup>144</sup>.

#### *ii. Electroporation et formation de pores ou la théorie initiale*

Le phénomène d'électroperméabilisation a été décrit par plusieurs modèles. En 1979, Abidor *et al.* ont initié l'hypothèse de la formation de pores dans la membrane en réponse à l'application de champs électriques <sup>147</sup>. Cette hypothèse a été reprise par différentes équipes dans les années suivantes <sup>155, 156</sup>. Chang et Reese ont ainsi essayé d'observer les pores formés par électroporation dans une membrane au microscope électronique et ont publié un article en 1990 montrant ce qu'ils interprétaient alors comme des pores membranaires (Figure 35).



**Figure 35 : Surface de membrane d'érythrocytes humains cryogénisés 40 ms après l'application d'impulsions électriques électroporantes.** Observation au microscope électronique avec un grossissement de 60 000x. Source : Chang et Reese (1990) <sup>157</sup>

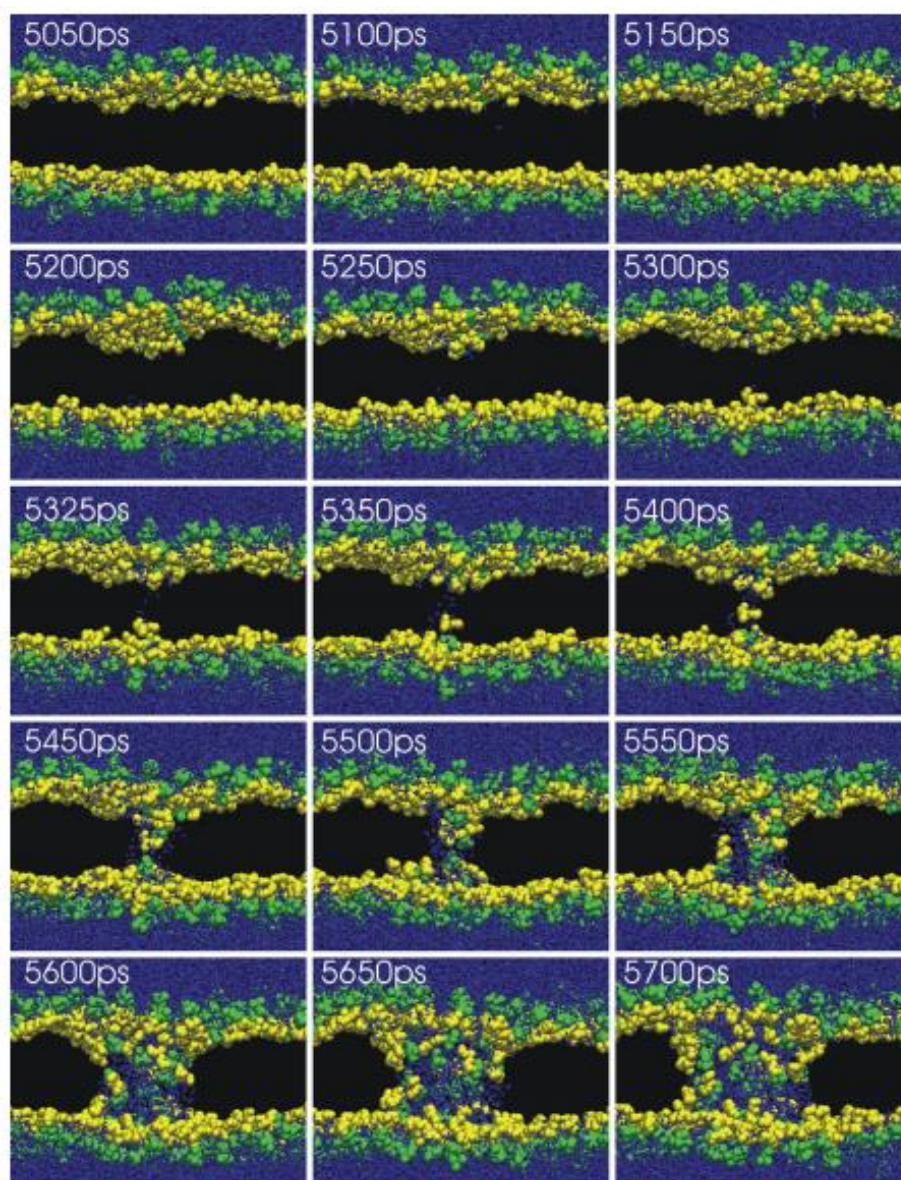
Ces observations réalisées en milieu hypotonique n'ont pas pu être reproduites sur d'autres types cellulaires et dans d'autres conditions d'osmolarité. Il a été admis par la suite que ces images étaient dues à un artéfact causé par la technique de fixation des membranes. Depuis cette période, personne n'a pu réellement observer de pores dus à l'électroporation dans des bicouches lipidiques.

Cependant, l'apparition de travaux de dynamique moléculaire sur l'électroporation a permis de visualiser numériquement des pores virtuels *in silico*. Ces expériences reposent sur de nombreuses hypothèses ainsi que sur les propriétés physico-chimiques des membranes. En 2004, Tieleman a travaillé sur des portions virtuelles de bicouche lipidique de 26x29 nm et a publié des images de ces pores virtuels (Figure 36) <sup>158</sup>. Il explique que la formation de pores est due au gradient de champ électrique local à l'interface entre l'eau et les lipides. Les molécules d'eau peuvent bouger dans ce gradient de champs électrique ce qui augmente la probabilité d'observer une molécule d'eau traverser la membrane plasmique. Ce passage d'une molécule d'eau entraîne une augmentation du champ local qui accélère le phénomène et permet le grossissement de la colonne d'eau formée jusqu'à la formation d'un pore complètement hydrophile.

L'année suivante, Tarek a confirmé ces résultats et a montré que ces défauts dans l'eau interfaciale se formaient de part et d'autre de la membrane et finissaient par se rejoindre pour former un canal hydrophile. Il a aussi montré que le temps nécessaire pour observer la création d'un pore dépend de l'intensité du champ électrique appliqué (1 ns lorsque  $0,5 \text{ V.nm}^{-1}$  sont appliqués contre 200 ps pour  $1 \text{ V.nm}^{-1}$ ) et que la membrane se refermait en quelques nanosecondes après la fin de l'impulsion électrique <sup>159</sup>. Tarek et Tieleman ont aussi montré dans leurs articles respectifs que les têtes polaires des phospholipides stabilisaient le canal formé au milieu de la membrane. De plus, des lipides pourraient passer d'un feuillet à l'autre de la membrane le long de ces canaux hydrophiles et passer de la couche intérieure

de la membrane à la couche extérieure et inversement. Cela est en accord avec l'externalisation des PtdSer observée lors de l'électroporation induite par des impulsions microseconde<sup>160</sup> ou nanoseconde (Cf. III. A. 3 d) ) (alors qu'ils sont normalement retrouvées principalement dans la couche interne de la membrane plasmique, Cf. I. A. 2) d)).

En 2007, Vernier et Ziegler ont eux aussi confirmé les travaux antérieurs et ont publié que les moment dipolaires des têtes des phospholipides ainsi que des molécules d'eau interfaciale s'alignent le long du champ électrique et que ce mécanisme est impliqué dans la formation des pores<sup>161</sup>. En 2010, Levine et Vernier ont étudié le cycle de « vie » des pores et les temps nécessaires à la création et à la disparition des pores sous l'influence d'un champ électrique. Ils ont montré que les temps nécessaires à la formation et à la disparition d'un pore dépendent du champ appliqué. Cependant le temps de formation d'un pore est plus court que celui de sa disparition (de l'ordre de 1 ns et de 10 ns respectivement)<sup>162</sup>. En 2012, ils ont aussi montré que la présence de calcium et de phospholipides dont la tête est chargée (telle que la PtdSer) augmentait le temps de création d'un pore et diminuait son temps de disparition<sup>163</sup>. La disparition rapide des pores a été vérifiée grâce à des expériences de Breton *et al.* sur des vésicules lipidiques suivant l'entrée de siARN fluorescents. En effet, lorsque le champ est arrêté, il est possible d'observer des molécules fluorescentes prises au piège dans la bicouche lipidique (comme l'avait prédit la dynamique moléculaire)<sup>71</sup>.



**Figure 36 : Prises de vue d'une simulation *in silico* d'une bicouche lipidique de Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) soumise à un champ électrique de  $0,5 \text{ kV.m}^{-1}$  en présence de 1 M de NaCl. La série commence à 5050 ps quand il n'y a pas encore de signe clair de formation de pore. Les ions et les chaînes carbonées des lipides ne sont pas représentés pour la clarté de l'illustration. Les parties choline des têtes des phospholipides sont représentées en vert et la partie phosphate/glycérol est représentée en jaune. Le potentiel est positif en haut de chaque prise de vue par rapport au bas. Source Tieleman (2004) <sup>158</sup>.**

L'équipe de T. Vernier a récemment publié que l'orientation des molécules d'eau interfaciale est en fait l'élément primordial à l'origine de la formation des pores et que la bicouche lipidique est en fait un composé passif dans ce phénomène puisque si cette bicouche est virtuellement remplacée par une couche de vide, on observe les mêmes mécanismes <sup>164</sup>.

Tous ces travaux confirment que la traversée d'une molécule d'eau à travers une bicouche lipidique est un évènement stochastique dont la probabilité d'apparition est augmentée par l'application d'un champ électrique suffisamment important. De plus, il semblerait qu'il y ait

une plus grande probabilité d'observer l'apparition d'un pore dans une zone de la membrane présentant un défaut <sup>165</sup>.

Les mécanismes de la perméabilisation membranaire faite par les impulsions nanoseconde ont été étudiés à l'aide de la DM. Les différents travaux de DM réalisés sur les impulsions nanoseconde montrent que, sous l'action d'un champ électrique de très forte intensité, l'eau se comporte comme un dipôle électrique qui peut s'orienter en quelques ps et générer un potentiel transmembranaire induit sans que les ions ne soient impliqués <sup>71, 166</sup>. D'après ce point de vue, les mécanismes à l'origine de la perméabilisation induite par les impulsions nanoseconde sont légèrement différents de ceux impliqués dans la perméabilisation par des impulsions microseconde ou milliseconde. Dans les deux cas, il y a rupture de la membrane due à une différence de potentiel au niveau de la membrane mais pour les impulsions milliseconde ou microseconde, cette différence de potentiel est due principalement à l'accumulation de charges alors que pour les impulsions nanosecondes elle est principalement due à l'orientation des moléculaires polaires d'eau dans un premier temps.

Ces modèles numériques expliquent certains des aspects de l'électroperméabilisation des membranes mais n'expliquent pas pourquoi il est possible d'observer la perméabilisation de la membrane pendant une durée allant jusqu'à 50 min après les impulsions électriques <sup>131</sup> et il ne prend pas en compte la présence des protéines dans la membrane. Il semblerait que ce modèle ne soit pas suffisant, à lui seul, pour expliquer le phénomène de la perméabilisation par des champs électriques.

### *iii. Electroperméabilisation et modifications des propriétés physico-chimiques de la bicouche lipidique*

Différentes études faites sur cellules ou en DM ont montré que la perméabilisation des membranes était liée à des productions de ROS et à des réactions d'oxydation des lipides. Benov *et al.* ont montré que des impulsions électriques à décroissance exponentielle de 5,2 ms et de 200 à 750 V.m<sup>-1</sup> permettent de générer des peroxydations de lipides dans des émulsions d'acides gras, des membranes de liposomes, de globules rouges et de cellules tumorales <sup>167</sup>. Ces peroxydations impliquent des ROS puisque ces réactions peuvent être inhibées par l'ajout de pièges à ROS. Il semblerait que ces peroxydations aient lieu au niveau des insaturations des chaînes carbonées des lipides. Plus tard, un article de Gabriel et Teissié a aussi associé l'électroporation avec la formation d'espèces oxydantes <sup>168</sup>. Quatre ans après, Bonnafous *et al.* ont montré que les ROS ne sont présents que dans le cas où la perméabilisation est réversible et qu'ils sont localisés au niveau des zones perméabilisées des membranes <sup>169</sup>. Pour finir, en 2009, il a été montré que l'oxydation des lipides de la membrane plasmique par des agents responsables du stress oxydant permettait

d'augmenter la susceptibilité de la membrane à l'électroperméabilisation. Ces travaux ont été réalisés sur des modèles *in silico* et *in vitro*<sup>170</sup>.

Ces informations ont permis de faire émerger une nouvelle théorie sur les mécanismes à l'origine de l'électroperméabilisation dans l'équipe où cette thèse a été réalisée, c'est-à-dire, dans l'équipe de L.M. Mir. Il semblerait que l'oxydation des lipides induite par les champs électriques soit à l'origine de la perméabilisation « longue durée » des objets soumis à ces champs électriques. En effet, l'oxydation des insaturations des phospholipides change les propriétés physico-chimiques de la membrane et peut expliquer que les membranes restent perméables plusieurs minutes après l'application des impulsions<sup>171</sup>.

Il est donc très important de différencier le terme électroporation du terme électroperméabilisation, ce dernier englobant les effets à court terme dus aux pores et les effets à long terme pouvant être dus à des phénomènes d'oxydation. Il semblerait que ces deux phénomènes apparaissent à la suite de l'application d'un champ électrique. Le terme électroperméabilisation devrait donc être utilisé pour parler des effets globaux de l'application d'impulsions électriques sur des cellules, des vésicules ou des bicouches lipidiques planes artificielles alors que le terme électroporation devrait être réservé aux effets de ces impulsions dus à la présence de pores pendant que les impulsions sont délivrées et quelques nanosecondes après.

#### d) La réparation de la membrane

Le phénomène d'électroperméabilisation est un phénomène qui peut être réversible<sup>143</sup> ou irréversible<sup>122</sup> selon les paramètres électriques utilisés. Dans le cas où l'effet de ces impulsions est réversible, il y a réparation de la membrane. Ce phénomène est aussi appelé « resealing » de la membrane en référence à la fermeture des pores<sup>172</sup>. Ce phénomène est retrouvé lorsque des bicouches lipidiques planes artificielles sont perméabilisées donc il peut se produire de manière passive<sup>152, 173</sup>. Cependant, la réparation de la membrane est beaucoup plus rapide dans le cas des bicouches lipidiques planes que dans le cas des cellules. L'état perméabilisé de la membrane après électroperméabilisation peut durer de quelques minutes à quelques dizaines de minutes selon les types cellulaires observés.

Plusieurs paramètres peuvent influencer la vitesse de réparation de la membrane :

- les fibres du cytosquelette, et plus particulièrement les microtubules, peuvent ralentir ce phénomène comme le montrent les expériences de Teissié et Rols relatant l'augmentation de la vitesse de récupération lorsque les microtubules sont altérés par de la colchicine<sup>174</sup>,
- la température : plus celle-ci est basse, plus la durée de vie de l'état perméabilisé est importante. A 4°C, on observe même que la réparation est inhibée<sup>175</sup>,

- la conductivité du milieu extracellulaire : plus le milieu est conducteur, plus la récupération est rapide<sup>176</sup>,
- les quantités d'ATP et d'ADP présents dans la cellule : dans le cas des cellules, une partie du mécanisme de réparation semble nécessiter de l'énergie et donc être actif<sup>174</sup>.

De plus, une des hypothèses associées à la théorie expliquant la perméabilisation à long terme des membranes cellulaires par l'oxydation des lipides est que l'oxydation des lipides est un phénomène irréversible qui affecte une part importante de la surface de la membrane et qui ne peut être réparé que par la mise en place de lipides non oxydés dans la membrane. L'exocytose de membranes pourrait donc permettre de remplacer les lipides oxydés par des lipides non exposés aux impulsions électriques. De plus, cette explication est cohérente avec l'implication du cytosquelette et de la température (en agissant sur la fluidité des membranes) et avec l'hypothèse d'un mécanisme actif. Dans les modèles de bicouches lipidiques planes artificielles ou de vésicules lipidiques, il n'y a pas de signe d'électroperméabilisation à moyen terme (quelques dizaines de secondes à quelques minutes). Il est possible que cela soit dû à l'utilisation de lipides non oxydables (comme le DPPC, par exemple) ou à l'utilisation de paramètres électriques trop faibles pour générer une oxydation des lipides des bicouches artificielles. Dans ce cas, la perméabilisation observée ne serait due qu'à l'électroporation de la membrane.

#### e) Effet des impulsions microseconde sur les structures cellulaires internes

Il a été montré dans des papiers récents que les impulsions microseconde pourraient avoir un effet sur les organites cellulaires. En effet, l'équipe de J.C. Weaver a montré par la simulation numérique que lorsque la membrane plasmique est perméabilisée par une impulsion plus longue que le temps de charge de la membrane (40  $\mu$ s dans le cas étudié dans cet article) une partie du champ électrique appliqué affecte l'intérieur de la cellule<sup>177</sup>. Il est donc possible de générer une différence de potentiel entre le cytoplasme et l'intérieur des organites. Cependant, les organites étant des structures de plus petite taille que la cellule elle-même, il faut appliquer un champ électrique plus important pour perméabiliser ces organites avec des impulsions microseconde. L'utilisation de champs électriques de plus forte amplitude que ceux utilisés classiquement en électroporation aura une toxicité plus importante ce qui est un frein à l'utilisation des impulsions microsecondes pour perméabiliser les organites. Cependant, ces travaux rappellent que l'activation des canaux voltage dépendant présents sur les membranes des organites peut se produire pour des champs électriques de l'ordre de ceux utilisés en électroporation classique. D'après ce modèle, il serait donc possible d'affecter la perméabilisation des organites cellulaires avec l'utilisation

d'impulsions électriques par le biais de l'activation des canaux voltage dépendant de ces organites (effet indirect).

Expérimentalement, Skolucka *et al.* ont montré que l'application d'impulsions de 5 impulsions de 50  $\mu\text{s}$  et de 250  $\text{kV.m}^{-1}$  pouvait entraîner des effets intracellulaires tels qu'un gonflement du réticulum endoplasmique sur des fibroblastes. Ce gonflement des vésicules du réticulum endoplasmique pourrait être dû à l'entrée d'eau permise grâce à l'électroporation de la membrane du réticulum<sup>178</sup>. L'amplitude de champ appliquée dans ces travaux est à la limite des amplitudes de champ appliquées dans le domaine de la perméabilisation irréversible ce qui est en accord avec la simulation numérique mais pose encore le problème de la viabilité cellulaire.

## **D. Les applications de la perméabilisation membranaire**

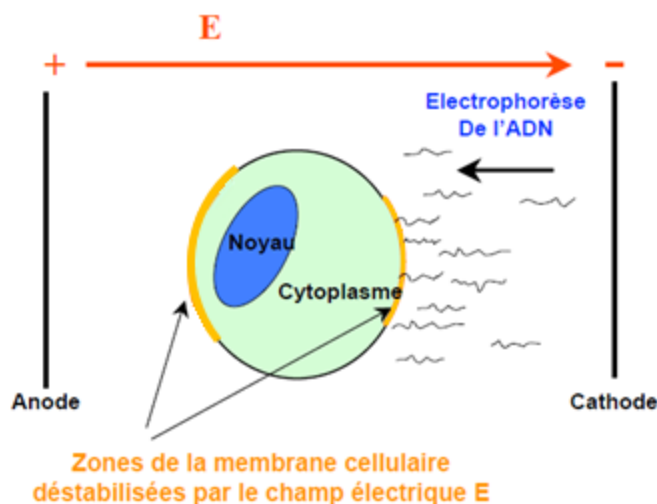
### **1) Le transfert de gènes *in vitro* et *in vivo***

#### **a) Principe**

L'électrotransfert de gènes est une technique sûre de transfection non virale utilisant des impulsions électriques microsecondes et millisecondes. Différentes formes d'impulsions peuvent être employées telles que des impulsions rectangulaires (le plus souvent) ou des impulsions à décroissance exponentielle.

*In vitro*, les impulsions HV microseconde seules peuvent permettre d'effectuer efficacement l'électrotransfert de gènes alors qu'*in vivo* ces impulsions doivent être combinées à des impulsions LV milliseconde pour générer une force électrophorétique qui permet de déplacer les molécules d'acides nucléiques (qui sont chargées) dans le tissu à transfecter (Figure 37). Les impulsions millisecondes peuvent être utilisées pour transfecter efficacement les cellules *in vitro* et *in vivo*.





**Figure 37 : Principe de l'électrotransfert d'acides nucléiques**

#### b) Historique

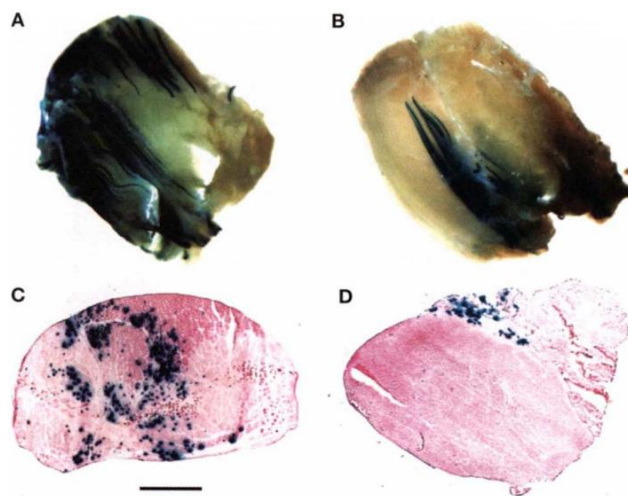
La première expérience d'électrotransfert d'ADN *in vitro* date de 1982 avec les travaux de Neumann *et al.* où des cellules L murines déficientes pour le gène codant pour la thymidine kinase (TK) ont été transfectées avec de l'ADN circulaire et linéaire possédant le gène codant pour la TK<sup>72</sup>. Les cellules transfectées ont récupéré le phénotype TK<sup>+</sup>. Dans ces travaux, un train de 3 impulsions à décroissance exponentielle avec  $\tau_i = 5 \mu s$  et une amplitude maximale de 8 kV/cm a été appliqué. Dans cet article, l'ADN linéaire semblait plus efficace que l'ADN circulaire mais cette hypothèse a été controversée par la suite. L'hypothèse présentée était que le champ électrique appliqué sur les cellules perturbe la membrane plasmique au niveau de la partie lipidique et permet la création de pores dans la membrane facilitant l'entrée de l'ADN dans le cytoplasme. Ce protocole était décrit comme simple, rapide et applicable à de nombreux types cellulaires par rapport aux autres protocoles utilisés à cet époque (utilisation de vecteurs viraux<sup>179</sup>, utilisation de composés chimiques tels que le phosphate de  $Ca^{2+}$  ou le diéthylaminoéthyl-dextran (DEAE-dextran)<sup>180</sup> ou injection d'ADN dans le noyau<sup>181</sup>).

Dans les années qui ont suivi, différentes études ont validé ces résultats sur des cellules animales et humaines ainsi que sur des cellules végétales. Potter *et al.* (1984) ont réalisé l'électrotransfert du gène  $\kappa$  codant pour une chaîne légère d'immunoglobuline sur des précurseurs de cellules B de souris en utilisant des impulsions de 4 kV sur une distance de 0,5 cm<sup>182</sup>. Puis, Fromm *et al.* ont appliqué la technique de l'électroporation aux cellules végétales<sup>121</sup>. En effet, ils ont transfecté des protoplastes (cellules végétales dont la paroi a été retirée) de carotte, de tabac et de maïs avec un gène codant pour l'expression de la chloramphénicol acétyltransférase montrant ainsi que la technique était applicable aux plantes monocotylédones et aux dicotylédones. Depuis, cette technique a été beaucoup

développée et elle est maintenant utilisée couramment en laboratoire sur des cellules procaryotes, eucaryotes, animales ou végétales.

Le début de l'électrotransfert de gènes *in vivo* date de 1991 avec les travaux de Titomirov *et al.* (1991). De l'ADN codant pour un gène de résistance à la Néomycine et un gène d'immortalisation cellulaire a été injecté de manière sous-cutanée puis a été introduit dans des cellules de peau de souris par électroporation<sup>183</sup> en appliquant deux impulsions à décroissance exponentielle de polarité opposée<sup>121</sup>. Par la suite, Heller *et al.* (1996) ont montré qu'il était possible d'électrotransférer le foie de rats après injection locale de plasmides codants pour la luciférase ou la  $\beta$ -galactosidase<sup>184</sup>. Cette technique était basée sur six impulsions rectangulaires de 99  $\mu$ s (de fréquence 1Hz) et a permis de transférer 30 à 40% des cellules exposées au champ électrique. De plus, ces cellules ont présenté une expression transitoire du plasmide pendant plus de 21 jours après l'électroporation.

En 1998, plusieurs études ont été publiées rapportant l'efficacité de l'électrotransfert de gènes utilisant des impulsions milliseconde dans différents tissus comme le foie de rats<sup>185</sup> (huit impulsions rectangulaires de 50 ms), le muscle de souris<sup>186, 73</sup> (respectivement trois impulsions rectangulaires de 50 ms suivies de trois autres impulsions de polarité inversée, Cf. Figure 38, ou huit impulsions de 20 ms délivrées à 1 Hz), ou dans les tumeurs de type mélanome<sup>187</sup> (10 impulsions rectangulaires de 5 ms délivrées à 1 Hz).



**Figure 38 : Marquage histochimique de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase dans le muscle de souris après transfert du gène pCAGGS-LacZ avec ou sans électroperméabilisation.** La partie antérieure bilatérale du muscle tibialis a été anesthésiée à la bupivacaïne et a reçu une injection de plasmide pCAGGS-LacZ puis a été traitée avec trois impulsions électriques de 50 ms et de 20 kV.m<sup>-1</sup> suivies de trois autres impulsions de polarité inversée (A et C) ou n'a pas été traitée avec des impulsions électriques (B et D). 5 jours plus tard, le muscle a été excisé et marqué pour l'activité de la  $\beta$ -galactosidase. A et B : muscles entiers. C et D : section transversale de l'échantillon de muscle marqué pour l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et recolorée à l'éosine. La barre d'échelle fait 1 mm. Source : Aihara et Miyazaki (1998)<sup>186</sup>.

A l'heure actuelle, l'électroporation est appliquée dans le traitement de l'homme et de l'animal et est devenue une technique courante dans le domaine de la thérapie génique utilisant une approche non virale (*in vitro*, *in vivo* et dans le domaine de la clinique).

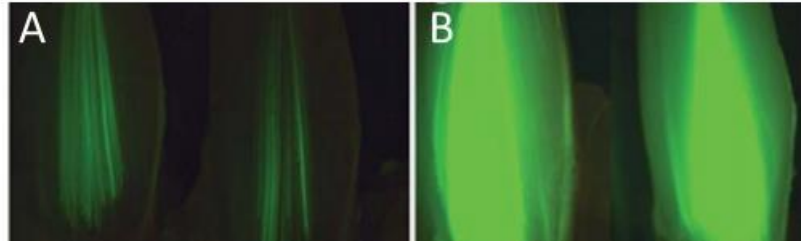
### c) Applications

On distingue deux types d'applications du transfert de gènes : l'utilisation pour la recherche biologique et les applications médicales. Dans la recherche biologique, ce sont des gènes rapporteurs qui sont transfectés. Dans le domaine des applications à visées thérapeutiques, il y a différentes approches : la thérapie génique qui concerne l'électroporation de séquences thérapeutiques, la vaccination à ADN visant à faire reconnaître des épitopes de cellules pathogènes par le système immunitaire, et la génération de cellules souches pluripotentes en utilisant des gènes de reprogrammation (cette technique peut être utilisée en régénération tissulaire). Cependant, la génération de cellules souches pluripotentes peut aussi être utilisée dans la recherche biologique pour comprendre certaines pathologies ainsi que les mécanismes de la dédifférenciation cellulaire.

#### i. Transfert de gènes rapporteurs

Il existe plusieurs types de gènes rapporteurs utilisés dans le domaine de la transfection pour évaluer la mise au point de la technique testée. Ils permettent de localiser facilement les cellules qui ont internalisé et exprimé le gène transfecté et d'évaluer l'intensité de l'expression de la protéine d'intérêt dans ces cellules. Ces différents gènes permettent aussi d'évaluer la perméabilisation de la membrane et sont suivis par des techniques optiques (Cf. II. A. 1) c). Les gènes rapporteurs les plus courants sont :

- le gène codant pour la luciférase qui en présence de luciférine et d'ATP permet l'émission d'une bioluminescence qui peut être suivie avec un luminomètre,
- le gène codant pour la GFP qui est une protéine fluorescente verte (d'autres protéines fluorescentes d'autres couleurs ont été dérivées de la GFP) et qui peut être suivie par cytométrie en flux ou par microscopie à fluorescence (Figure 39),
- le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase dont l'expression est visualisée grâce au X-gal (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside). Le X-gal est un hétéroside du galactose lié à un noyau indole incolore. Ce noyau peut être hydrolysé par la  $\beta$ -galactosidase ce qui génère la libération de la partie indole qui par oxydation donne une coloration bleue (Figure 38).

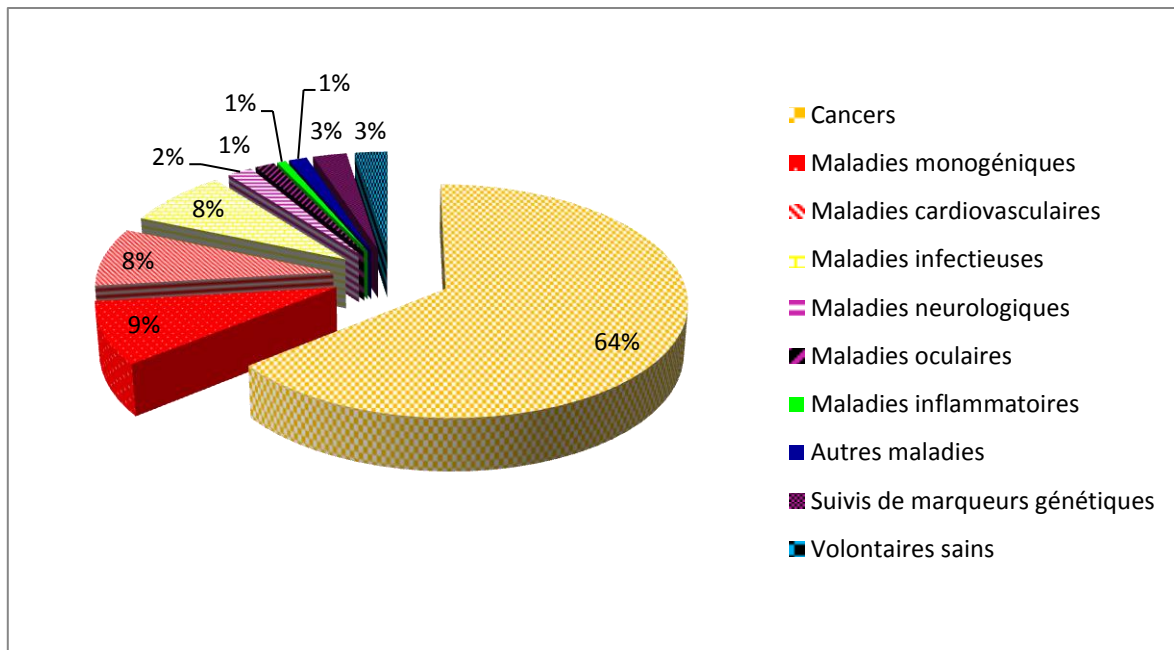


**Figure 39 : Expression de la GFP dans le muscle tibialis cranialis de souris après électrotransfert d'ADN par combinaison d'une impulsion HV ( $80 \text{ kV.m}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{s}$ ) et d'une impulsion LV de 400 ms. A amplitude du LV :  $6 \text{ kV.m}^{-1}$ . B : amplitude du LV  $10 \text{ kV.m}^{-1}$ . D'après Satkauskas *et al.* (2005)<sup>188</sup>**

Ces plasmides permettent de quantifier l'intensité de l'expression et le pourcentage de cellules exprimant la protéine d'intérêt (surtout pour les GFP et la luciférase). Ces différents gènes sont donc essentiels dans la démarche d'optimisation du protocole d'électrotransfert. En effet, les conditions de l'électrotransfert *in vitro* et *in vivo* doivent être adaptées en fonction du type cellulaire utilisé, de la séquence d'ADN utilisée (la taille est le paramètre le plus limitant), de la géométrie et de la taille des électrodes et du milieu dans lequel est faite l'électroporation (quand il peut être contrôlé, donc *in vitro*). Il y a toujours un compromis à trouver entre l'efficacité de la transfection et l'intensité des dégâts dans le tissu ou la mortalité cellulaire.

## ii. Thérapie génique

La thérapie génique est une technique innovante permettant de remplacer un gène défectueux ou d'exprimer une protéine d'intérêt thérapeutique agissant comme un médicament chez un patient malade. La thérapie génique est utilisée majoritairement dans le but de traiter des cancers (64% des essais cliniques de thérapie génique en cours) comme le montre la Figure 40.



**Figure 40 : Cibles thérapeutiques de la thérapie génique (incluant la vaccination à ADN). Le pourcentage indiqué correspond aux protocoles d'essais cliniques menés dans les différentes pathologies par rapport à tous les essais cliniques menés en thérapie génique. D'après <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>, données de 2013.**

Il existe plusieurs stratégies dans le traitement de maladies par thérapies géniques. Ces stratégies dépendent des mécanismes impliqués dans la pathologie. Les différentes approches sont :

- le remplacement d'un gène défectueux par un gène fonctionnel : cette approche est surtout utilisée dans la cadre des maladies monogéniques où une protéine est manquante chez le patient suite à une mutation. C'est le cas, par exemple, dans certaines maladies telles que :
  - le Déficit Immunitaire Combiné Sévère (SCID en anglais) où une mutation est à l'origine d'une déficience de la chaîne commune  $\gamma$  des récepteurs des lymphocytes T rendant le système immunitaire inefficace,
  - la mucoviscidose, où la protéine Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) est mutée, entraînant une augmentation de la viscosité du mucus et une accumulation de ce mucus dans les voies respiratoires.
- la correction d'une mutation ponctuelle, qui permet de « réparer » le gène défectueux *in situ* et donc de garantir que son expression soit totalement inchangée après le traitement. L'ajout de chiméraplastes (oligonucléotides ARN/ADN) entraîne un mauvais appariement dans la séquence d'ADN endogène qui peut être réparée par

les enzymes de la réparation de l'ADN. Ces enzymes introduisent une mutation capable de rétablir la fonction du gène défectueux (technique peu efficace, controversée et n'ayant pas encore été combinée à l'électroporation),

- l'inhibition d'un gène muté produisant une protéine toxique qui permet dans certains cas de supprimer l'effet pathogène de la mutation. Cette stratégie est utilisée dans le cas de mutation sur le récepteur au facteur de croissance épidermal (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) qui est à l'origine de nombreux cancers tels que le cancer du poumon non à petites cellules et certains gliomes. L'introduction d'un siARN permet d'inhiber par « silencing » l'expression de la protéine mutée <sup>189</sup>,
- la correction d'un épissage alternatif incorrect qui peut être à l'origine d'une protéine toxique. Dans ce cas, l'ajout d'une séquence oligonucléotidique antisens permet de modifier l'épissage alternatif et de rendre sa fonction à une protéine mutée <sup>129</sup> (technique aussi appelée « exon skipping » <sup>136</sup>),
- l'introduction d'un gène suicide qui peut soit entraîner directement l'apoptose des cellules transfectées soit rendre certaines cellules comme, les cellules cancéreuses qui se divisent activement, plus sensibles à un médicament. Cette stratégie peut être utilisée avec le gène de la TK du virus Herpès simplex (HSV tk) qui sensibilise les cellules transfectées se divisant beaucoup (donc majoritairement les cellules cancéreuses) au Ganciclovir rendant ce traitement 1 000 à 10 000 fois plus efficace <sup>190, 191</sup>,
- le recrutement des cellules immunitaires qui permet d'activer localement le système immunitaire pour qu'il lutte contre la prolifération cellulaire des cellules tumorales grâce à l'expression d'une protéine telle que l'InterLeukine-12 (IL-12) <sup>192, 193</sup> dans le voisinage de la tumeur,
- l'introduction d'un gène produisant une molécule thérapeutique *in situ* qui repose sur la production du médicament par les cellules saines de l'organisme et qui peuvent être éloignées des cellules malades. Cette approche peut être utilisée pour générer la sécrétion de molécules telles que l'érythropoïétine (EPO) <sup>194, 195</sup> ou des anticorps monoclonaux <sup>196, 197</sup>. Le plus souvent, l'électroporation se fait au niveau des cellules du muscle squelettique car ces cellules ont une longue espérance de vie et permettent une expression transitoire du plasmide de longue durée.

### iii. Vaccins à ADN

Une autre stratégie de la thérapie génique est la vaccination à ADN dont le but est d'injecter de l'ADN codant pour un épitope de surface des cellules pathogènes, comme les cellules cancéreuses, pour entraîner le système immunitaire à agir contre ces cellules pathogènes. Par exemple, il est possible de faire exprimer un antigène spécifique de certains mélanomes

(comme l'antigène MAGE, Melanoma Associated AntiGen) pour augmenter la présentation de cet antigène au système immunitaire par l'intermédiaire du CMH 1 (protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité présentatrice de soi). De cette manière la réaction du système immunitaire contre la tumeur sera stimulée<sup>198, 199</sup>. Il existe bien d'autres cibles de la vaccination à ADN comme par exemple certains cancers de la prostate en ciblant l'antigène spécifique de la prostate (PSA)<sup>200</sup> ou certains papillomavirus<sup>201</sup>.

#### *iv. Génération de cellules souches*

L'intérêt des biologistes et des médecins pour les cellules souches est en plein essor mais l'accès à ces cellules est très restreint pour des raisons éthiques, ce qui limite beaucoup les études sur ces cellules totipotentes.

Depuis 2007, avec la parution des travaux de l'équipe du Pr. Yamanaka les biologistes sont capables de « dédifférencier » des cellules somatiques humaines en cellules souches par l'introduction de 4 gènes (initialement klf4, Oct3/4, Sox2, c-Myc<sup>202</sup> mais il a été montré plus tard qu'il était aussi possible de travailler avec d'autres gènes comme les gènes Nanog et Lin28<sup>203</sup>). Ces cellules reprogrammées sont appelées « Induced Pluripotent Stem cells » ou cellules iPS. Les premiers travaux publiés sur la génération d'iPS utilisaient des vecteurs viraux pour transfecter des fibroblastes. Depuis, d'autres types de cellules ont été utilisées pour générer des iPS tels que des cellules bêta du pancréas<sup>204</sup>, des progéniteurs de cellules neurales<sup>205, 206</sup> ou des kératinocytes<sup>207, 208</sup>. De plus, d'autres méthodes de vectorisation ont été développées car l'approche virale, bien qu'efficace peut poser des problèmes de sécurité car les virus peuvent générer une réponse immunitaire importante et certains vecteurs sont intégratifs.

Les gènes c-Myc et Klf4 sont des oncogènes, ce qui pose des problèmes de sécurité lorsque ces gènes sont intégrés et s'expriment pendant une longue période. Cependant les stratégies de transfection dans le cadre de la génération d'iPS ont pour but de n'exprimer les gènes exogènes que pendant une durée de quelques jours puis il est important que ces gènes subissent une extinction de leur expression mais que l'expression des gènes endogènes correspondants soit activée. L'électroporation d'ADN plasmidique ou d'ARN messenger (mARN) est une alternative très prometteuse qui a été développée ces dernières années car dans les deux cas il n'y a pas de présence de séquence virale et l'expression est transitoire et présente peu de risques d'intégration (voire pas du tout pour les mARN).

En 2008, Okita *et al.* ont publié une étude montrant qu'il était possible de produire des iPS à partir d'hépatocytes primaires de souris sans utiliser de vecteur viral intégratif mais en utilisant un vecteur adénoviral non intégratif, d'une part, et en utilisant une méthode non virale basée sur un produit chimique, le FuGENE6, d'autre part. Dans cette étude, il a fallu transfecter 4 fois les cellules, tous les deux jours avec le FuGENE6 car ce type de

transfection génère une expression transitoire et il faut que l'expression des transgènes soit suffisamment longue pour qu'il y ait génération d'iPS. En effet, il a été montré qu'il est nécessaire que les gènes transfectés exogènes s'expriment pendant au moins 10 à 12 jours après le début de la transfection puis qu'ils soient naturellement éteints par la cellule reprogrammée pour qu'il y ait génération d'iPS<sup>209, 210</sup>.

Il a été montré par la suite qu'il était possible de générer des iPS en utilisant l'électrotransfert de gènes en utilisant un plasmide codant pour les 4 gènes c-Myc, Klf4, Oct4 et Sox2 contrôlé par un promoteur CAG (Chicken Beta-Actine Gene)<sup>211</sup>. Par ailleurs, il a aussi été rapporté qu'il était possible de générer des iPS à partir de cellules souches neurales fœtales humaines en utilisant seulement les vecteurs Oct4 et Nanog clonés dans deux vecteurs autorépliatifs et combinés à l'électroporation<sup>212</sup>. Les vecteurs autorépliatifs sont des vecteurs non intégratifs qui possèdent une séquence telle que la séquence EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1) associée à une séquence oriP (origine de réplication) leur permettant de se répliquer indépendamment de l'ADN génomique de la cellule transfectée. Ce système permet de contrer le désavantage des techniques de transfection non virales qui est l'expression transitoire du plasmide (de courte durée) et cela entraîne une expression suffisamment longue du plasmide pour observer une reprogrammation complète.

D'autres travaux, ont montré l'efficacité de l'électrotransfert pour générer des iPS sur différents types cellulaires tels que des fibroblastes embryonnaires de souris (un électrotransfert de plasmide non épisomal, ou deux électrotransferts séparés de 3 jours)<sup>213</sup> ou des fibroblastes humains (une transfection de plasmide épisomal)<sup>214</sup>. Il est possible de reprogrammer des cellules en utilisant des impulsions rectangulaires (durée 10 ms)<sup>215</sup> ou des impulsions à décroissance exponentielle<sup>216</sup>.

En 2009, Papapetrou *et al.* ont fait une étude sur les proportions de plasmides à utiliser pour optimiser la reprogrammation des cellules somatiques en iPS. Ils ont montré que la meilleure efficacité de reprogrammation était observée lorsque les plasmides Sox2, Klf4 et c-Myc étaient transfectés en proportions égales et que Oct4 était trois fois plus concentré dans le mélange de gènes utilisé pour reprogrammer des fibroblastes humains<sup>217</sup>.

Cependant, l'utilisation d'impulsions électriques pour transfecter des cellules somatiques afin de générer des iPS reste encore peu utilisée, aujourd'hui, car l'efficacité de reprogrammation est inférieure à celle retrouvée avec l'utilisation de techniques virales (~0,001% d'efficacité pour l'électrotransfert de gènes contre ~0,01% pour les techniques virales). Lorsque des cellules sont reprogrammées dans un but de recherche sans intentions de les réimplanter chez un patient, les techniques virales sont satisfaisantes. Par contre, la technique de l'électrotransfert est très intéressante dans le cas où les cellules reprogrammées seraient amenées à être réimplantées chez le patient car la méthodologie est beaucoup plus sûre. En effet, cela évite le problème de l'intégration de la séquence lorsque des virus intégratifs sont



utilisés ainsi que le risque d'immunogénicité des particules virales. De plus, il est encore possible d'optimiser la technique de l'électrotransfert pour que son efficacité soit plus proche de celle des techniques virales. Il est donc envisageable de penser que dans les années à venir la technique de l'électrotransfert pour reprogrammer des cellules sera de plus en plus employée.

## 2) Le transfert de médicaments : l'électrochimiothérapie

L'électroperméabilisation peut être utilisée pour générer une entrée locale et massive de molécules ne pouvant pas ou très peu traverser la membrane plasmique en temps normal. Lorsque cette stratégie est utilisée avec des chimiothérapies on l'appelle électrochimiothérapie.

### a) Historique

Ce concept a été initié à la fin des années 80 avec les travaux d'Okino *et al.*<sup>218</sup> et d'Orlowski *et al.*<sup>68</sup> qui ont montré qu'il était possible de potentialiser certains médicaments anticancéreux grâce à l'application d'impulsions électriques *in vivo* (pour l'essai d'Okino *et al.*) et *in vitro* (pour les travaux d'Orlowski *et al.*). Cette potentialisation est plus importante pour les molécules hydrophiles que pour les molécules hydrophobes. En effet, les molécules hydrophobes telles que l'actinomycine D traversent facilement la membrane plasmique et donc l'application d'un champ électrique n'a que peu d'influence sur l'entrée de ces molécules. A l'inverse, les molécules hydrophiles qui ne traversent pas ou peu la membrane plasmique peuvent présenter une augmentation de la toxicité allant de 200 fois pour la netropsine jusqu'à 700 fois pour la bléomycine<sup>68</sup>.

En 1991, Mir *et al.* rapportent l'efficacité du principe présenté en 1988 en utilisant la bléomycine potentialisée par l'électroperméabilisation sur un modèle de souris avec des tumeurs transplantées en sous cutané. Cette technique de potentialisation de la bléomycine permet une réduction de taille et même une éradication de ces tumeurs transplantées<sup>219</sup> ainsi que celle de tumeurs spontanées de carcinomes mammaires chez des souris C3H/Bi<sup>220</sup>. La même année, Poddevin *et al.* ont démontré que cette potentialisation était due à l'internalisation de la bléomycine dans le cytosol grâce à l'action des impulsions électriques sur la stabilité de la membrane plasmique. De plus, ces travaux ont permis d'estimer de manière quantitative que l'internalisation de quelques centaines de molécules de bléomycine dans le cytoplasme est nécessaire pour induire la mort cellulaire<sup>59</sup>. L'efficacité du traitement a pu être améliorée lorsque des cellules allogéniques produisant de l'InterLeukine-2 (IL-2) ont été injectées dans l'espace entourant la tumeur<sup>221</sup>. Cette amélioration est aussi visible en injectant directement de l'IL-2 aux souris traitées<sup>222</sup>.

Le premier essai clinique d'électrochimiothérapie a commencé en 1991<sup>223</sup>. Il a été réalisé en appliquant des impulsions électriques (après avoir injecté la bléomycine par voie intraveineuse) sur 40 nodules de carcinomes squameux localisés sur la tête ou le cou de huit patients. Les impulsions électriques utilisées étaient des trains de quatre ou huit impulsions rectangulaires de 100  $\mu$ s et de 130 kV.m<sup>-1</sup>. Cet essai a montré une bonne tolérance du traitement par les patients et une efficacité antitumorale claire. Un autre essai clinique a été publié en 1996 après avoir traité 6 patients. L'essai présentait les réponses partielles ou totales de tumeurs de différents types (mélanomes, carcinomes basocellulaires et adénocarcinome métastatique) après utilisation de huit impulsions électriques similaires à celles utilisées dans l'essai clinique précédant<sup>224</sup>.

En 1986, Melvik *et al.* ont montré qu'il était possible de potentialiser la cytotoxicité du cis-diamminedichloroplatine(II) (cisplatine), un agent antitumoral efficace et beaucoup utilisé en clinique dans le monde, grâce à l'utilisation d'une série de décharges électrique de haut voltage. La potentialisation du cisplatine par l'électrochimiothérapie correspond à une augmentation de l'efficacité de ce médicament par un facteur 3 par rapport à son utilisation non potentialisée. Puis à partir de 1995, l'équipe de G. Sersa a développé l'électrochimiothérapie utilisant la potentialisation du cisplatine<sup>225, 226, 227</sup>.

Entre 2003 et 2005 s'est déroulée l'étude ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy). Jusqu'à cette date 247 patients avaient été traités pour différents types de tumeurs cutanées et sous-cutanées avec de la bléomycine et du cisplatine potentialisés par l'électroperméabilisation. Cependant les protocoles de ces différents essais cliniques n'étaient pas homogènes et ne permettaient pas de comparer les différents résultats<sup>228</sup> d'où l'intérêt de lancer cette étude ESOPE pour trouver les paramètres optimaux les plus sûrs et les plus efficaces pour les patients.

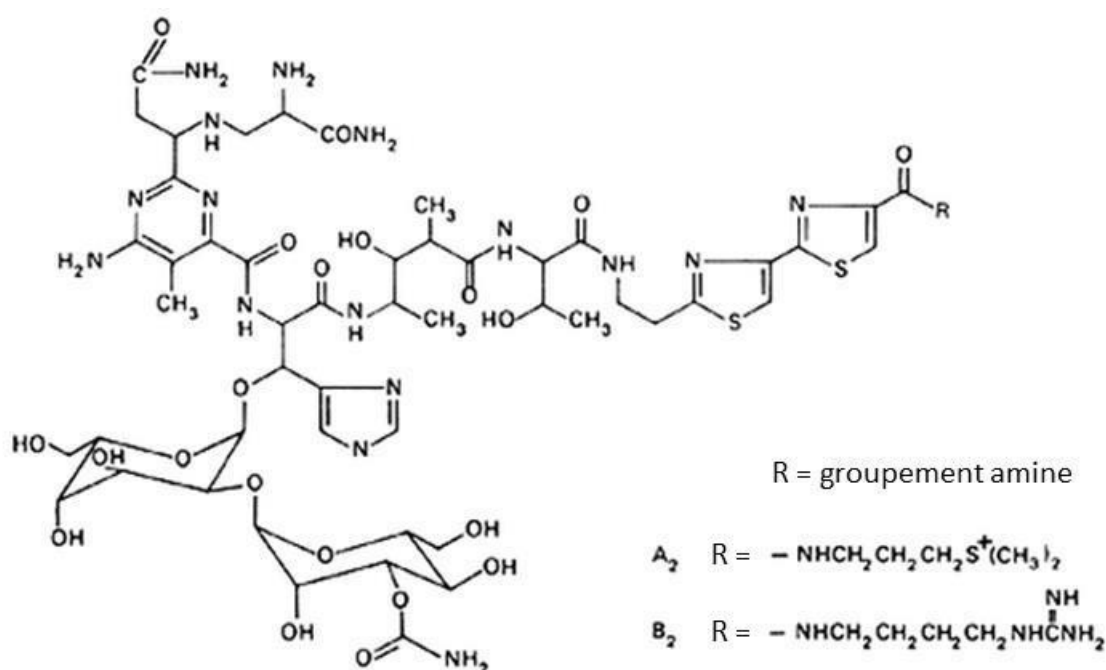
Cette étude a été faite sur 102 patients présentant des tumeurs cutanées et sous-cutanées et a permis, entre autre, de comparer l'efficacité de la bléomycine à celle du cisplatine ainsi que les différents modes d'administration du médicament (injection intraveineuse ou intratumorale)<sup>229</sup>. 85% des tumeurs traitées ont présenté une réponse objective au traitement mais sans effet du mode d'administration et du médicament utilisé. Différentes électrodes ont été utilisées en fonction de la lésion à traiter. Cependant dans le cas de tumeurs de plus de 0,5 cm<sup>3</sup> l'injection de la bléomycine par voie systémique a montré une augmentation significative de l'efficacité du traitement qui peut s'expliquer par une meilleure répartition du médicament dans la tumeur. Le cisplatine est, lui, toujours injecté en local pour éviter les forts effets secondaires que cette molécule peut générer.

L'électrochimiothérapie a aussi montré la même année une efficacité dans le traitement de grosses tumeurs de la paroi thoracique<sup>230</sup> ou dans le traitement de sarcomes de Kaposi<sup>231</sup>.

## b) Mécanisme d'action de la bléomycine et du cisplatine

### i. La bléomycine

La bléomycine regroupe en réalité un mélange de 11 composés de la famille des bléomycines qui ne diffèrent que par leur extrémité N terminale. Le composé le plus représenté dans le mélange est la bléomycine A2. Les bléomycines sont des antibiotiques glycoprotéiques de  $1500 \text{ g.mol}^{-1}$ , en moyenne, produits par *Streptomyces verticillus* (Figure 41).



**Figure 41 : Les molécules de bléomycine A2 et B2.** (Source : <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>)

La découverte de la bléomycine ainsi que les premiers articles rapportant son activité antitumorale datent du milieu des années 60.<sup>232, 233, 234</sup> Par la suite, il a été montré que la bléomycine était un traitement efficace contre différents cancers *in vivo* chez l'animal<sup>234</sup> puis chez l'homme<sup>235</sup>. La bléomycine a obtenu son autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration (FDA) en 1973. Les molécules de bléomycine sont composées de 4 sous-parties. Deux sous-parties sont impliquées dans la liaison de ces molécules à l'ADN, la troisième lie différents métaux de transition et le rôle de la quatrième partie (partie possédant deux sucres) est encore débattu<sup>236</sup>. Lorsqu'une molécule de bléomycine fixe du fer sous forme  $\text{Fe}^{2+}$  cela forme un complexe avec l' $\text{O}_2$  qui, une fois que le  $\text{Fe}^{2+}$  a été oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$ , est capable de générer une attaque nucléophile sur la position C4' du désoxyribose de l'ADN<sup>237</sup>. Cette coupure peut avoir lieu majoritairement sur des

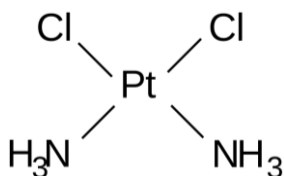
séquences GC ou GT mais aussi sur des séquences TT ou AT lorsque des ions  $\text{Fe}^{2+}$  sont présents<sup>238</sup>. Il a été montré qu'une molécule de bléomycine est capable de générer jusqu'à 8 à 10 coupures de l'ADN par cellule<sup>239</sup>. La bléomycine peut induire des coupures simple-brin ainsi que des coupures double-brin<sup>240</sup>.

Il a été montré par Poddevin *et al.*, en 1991, que la bléomycine ne pouvait pas diffuser librement à travers la membrane plasmique puisque la bléomycine radiomarquée introduite dans la cellule par électropériméabilisation n'a pas été observée hors de la cellule après la fermeture de la membrane<sup>59</sup>. En l'absence d'impulsion électrique la bléomycine entre faiblement dans la cellule grâce à une protéine membranaire de 250 kDa. Il semblerait que le mécanisme de l'endocytose médiée par récepteurs soit impliqué dans la toxicité de la bléomycine<sup>241</sup> lorsqu'elle est utilisée sans électropériméabilisation.

La bléomycine est utilisée actuellement en clinique comme chimiothérapie classique dans les tumeurs de types carcinomes squameux du cou et de la tête, lymphomes Hodgkiniens et non Hodgkiniens ainsi que dans des carcinomes testiculaires. Cependant l'efficacité de cette molécule est limitée et elle est toujours utilisée en association avec d'autres molécules. Par contre, elle présente peu d'effets secondaires lorsque les doses cumulées ne dépassent pas 300 mg BLM/m<sup>2</sup>. Au-dessus de cette dose, il y a un risque de fibrose pulmonaire<sup>236</sup>.

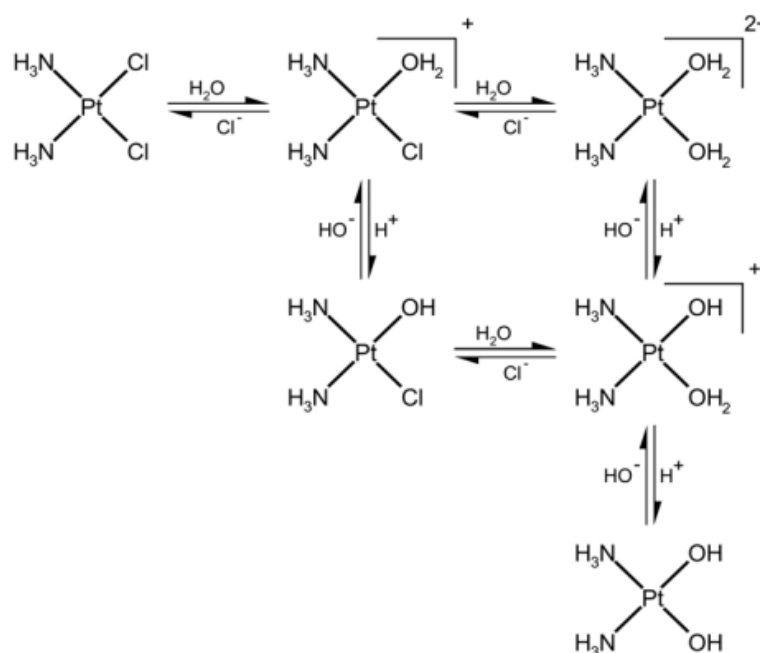
## ii. Le cisplatine

Le cisplatine ou cis-diamminedichloroplatine(II) est un complexe à base de platine. Son action cytotoxique a été découverte par hasard en 1965 par Rosenberg *et al.* qui ont observé une diminution de la croissance de bactéries *E. coli* lors du relargage d'ions platine au niveau d'électrodes soumises à un champ électrique. Ces ions se complexent avec des ligands du milieu et forment des complexes de transition (association d'un ion métallique avec des ligands neutres ou anioniques, différents des sels ioniques). Parmi les différents complexes de transition produits, le cisplatine a montré l'action la plus importante<sup>242</sup> (Figure 42).



**Figure 42 : Le complexe de transition du cisplatine**

En entrant dans la cellule où la concentration en  $\text{Cl}^-$  est moins élevée que dans le milieu extracellulaire (~3 mM contre 114 mM chez le muscle de mammifère<sup>243</sup>) le cisplatine perd ses ions  $\text{Cl}^-$  et est hydrolysé comme l'ont montré Jennerwein et Andrews en 1995<sup>244</sup> (Figure 43).



**Figure 43 : Schéma de l'hydrolyse du cisplatine.** Source : Jennerwein et Andrews (1995)  
244

Après hydrolyse, le cisplatine peut réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN au niveau de l'azote en position N7 d'une purine et générer des adduits mono- et bifonctionnels sur l'ADN<sup>245</sup>. Ces adduits entraînent des liaisons intrachâînes entre deux guanines adjacentes<sup>246</sup> ce qui est à l'origine de l'action alkylante du cisplatine et bloque la réplication de l'ADN.

Le cisplatine est utilisé dans le traitement des cancers de l'ovaire<sup>247, 248</sup>, des testicules<sup>249, 250</sup>, de la vessie<sup>251, 252</sup>, du col de l'utérus<sup>253, 254</sup>, de l'endomètre<sup>255, 256</sup>, de l'œsophage<sup>257, 258</sup> et des cancers de la sphère oto-rhino-laryngée<sup>259, 260</sup>. Contrairement à la bléomycine, il est responsable de nombreux effets secondaires tels que des nausées, des vomissements, une toxicité rénale, une toxicité auditive et une toxicité pour les glandes sexuelles.

### c) Applications actuelles en clinique

A partir du début des années 2000, le développement de l'électrochimiothérapie a été accompagnée du développement du Cliniporator (Figure 44), un dispositif médical permettant de délivrer les impulsions électriques aux patients et adapté à la clinique. Le Cliniporator a été développé par l'entreprise italienne IGEA (Carpi, Italie) en association avec les chercheurs à l'origine de l'électrochimiothérapie. Ce dispositif sûr et simple d'utilisation a été utilisé dans l'étude ESOPE<sup>229</sup> et a été commercialisé à partir de 2006.



**Figure 44 : Le Cliniporator**

Suite à la mise sur le marché de ce dispositif médical et à la publication du rapport du projet ESOPE rapportant l'efficacité de l'électrochimiothérapie (85% des tumeurs traitées ont présenté une réponse totale ou partielle au traitement), l'utilisation de l'électrochimiothérapie s'est répandue en Europe et ce traitement est devenu un traitement effectué en routine pour traiter des tumeurs cutanées et sous-cutanées. En septembre 2012, le 100<sup>ème</sup> hôpital européen a été équipé avec un Cliniporator. En 2013, 120 hôpitaux européens utilisent cette technologie et environ 7000 traitements ont été effectués. Le premier pays à avoir remboursé ce traitement a été l'Italie et depuis de plus en plus de pays le remboursent. De plus, l'organisme anglais NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) a donné une accréditation à l'électrochimiothérapie dans le cadre du traitement des métastases de la peau provenant de tumeurs cutanées ou non cutanées.

Ce traitement très peu invasif, simple d'utilisation, très efficace et ne présentant pratiquement pas d'effets secondaires est en train de devenir un nouveau traitement de référence dans le cadre du traitement des tumeurs cutanées et sous cutanées et de nombreuses études sont en cours pour étendre son utilisation à des tumeurs plus profondes. De plus, ce traitement est aussi utilisé en médecine vétérinaire.

#### d) Essais cliniques en cours

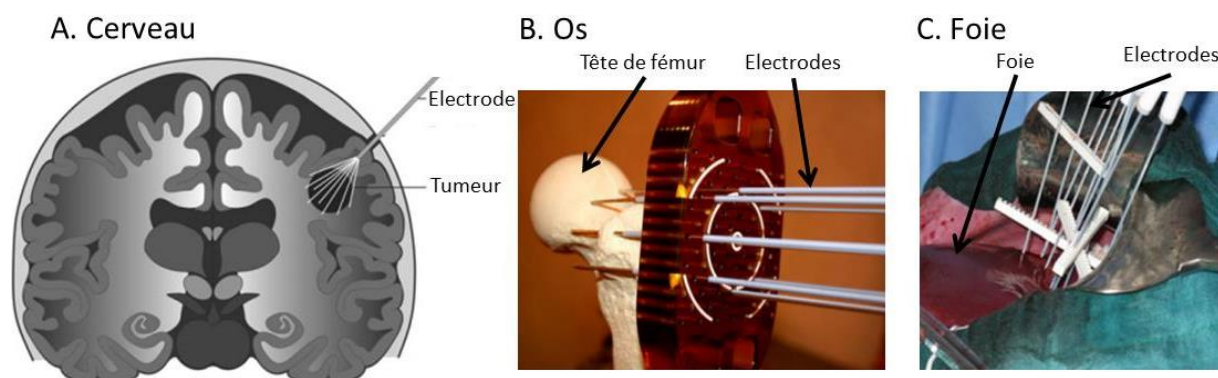
De nouveaux essais cliniques sont en cours dans différents pays européens et ont majoritairement pour but de traiter des tumeurs internes, plus difficiles d'accès, grâce à des électrodes plus invasives.

Les essais cliniques en cours sur l'électrochimiothérapie sont référencés dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Récapitulatif des essais cliniques d'électrochimiothérapie en cours (source : [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov))**

Date	Indication	Pays
Ouverture : 2005 (en cours)	Traitement des tumeurs du cou et de la tête	Angleterre
Ouverture : 2008 (en cours)	Traitement de métastases du foie	Slovénie
Ouverture : 2009 (en cours)	Traitement de tumeurs colorectales non opérables	Irlande
Ouverture : 2009 (en cours)	Traitement des chéloïdes et des cicatrices hypertrophiques	Italie
Ouverture : 2010 (en cours)	Comparaison de l'efficacité de l'électrochimiothérapie avec la chirurgie sur des tumeurs de carcinome basal	Irlande
Ouverture : 2011 (en cours)	Traitement palliatif des métastases cérébrales	Danemark
Publication : 2012 <sup>261</sup>	Traitement de cancers récurrents du torse provenant de cancer du sein après mastectomie	Italie
Communication : 2013 <sup>262</sup>	Traitement palliatif des tumeurs métastatiques des os	Italie

En parallèle de ces essais cliniques de nouvelles électrodes sont développées pour permettre d'accéder aux tumeurs profondes (Figure 45).



**Figure 45 : Différentes électrodes développées pour réaliser l'électrochimiothérapie sur des tumeurs profondes. D'après Miklavcic et al (2012)<sup>263</sup>**

### 3) L'électrofusion cellulaire

#### a) Historique

L'utilisation de champs électriques pour faire fusionner des cellules a été rapportée au début des années 80 avec les travaux de l'équipe d'U. Zimmermann (1980). Dans ces expériences, la diélectrophorèse a été utilisée avant l'application des impulsions électriques pour mettre des hématies en contact les unes avec les autres. La diélectrophorèse est un procédé qui utilise un champ électrique non-homogène alternatif pour permettre de déplacer les cellules. Le paramètre variable est la fréquence du champ électrique. En effet, la fréquence du champ électrique nécessaire au déplacement des cellules dépend des propriétés électriques des cellules étudiées ainsi que du milieu dans lequel la diélectrophorèse est réalisée. La fréquence doit être adaptée d'une expérience à une autre si le milieu ou le type cellulaire change. Après avoir aligné les hématies en « collier de perle » entre les électrodes, un champ électrique de 10 V a été appliqué sur des électrodes séparées par une distance de 120  $\mu\text{m}$  et où se situent les cellules et cela a entraîné la fusion des hématies<sup>264</sup>.

En 1981, L'équipe d'U. Zimmermann a publié 4 articles rapportant différentes expériences de fusion sur différents modèles cellulaires : formation d'homocaryons (cellules issues de la fusion de cellules identiques) de cellules primaires animales<sup>265</sup>, de cellules de lignée cellulaire animale<sup>266</sup>, de protoplastes de cellules végétales<sup>267</sup> et formation d'hétérocaryons (cellules issues de la fusion de cellules différentes) de cellules végétales (fusion de protoplastes de mésophylle avec des protoplastes de cellules de garde)<sup>268</sup>. Toutes ces expériences ont été réalisées en appliquant un champ électrique de quelques dizaines de  $\mu\text{s}$  et de quelques dizaines à quelques centaines de  $\text{kV.m}^{-1}$  dans un milieu hypotonique (pour favoriser un grossissement des cellules) et de faible conductivité (pour permettre la diélectrophorèse). Les auteurs rapportent que les fusions sont terminées entre quelques minutes et quelques dizaines de minutes après l'application de l'impulsion électrique responsable de la déstabilisation de la membrane. La même année, Weber *et al.* ont utilisé cette technique pour améliorer la fusion de protoplastes de levures en présence de PEG<sup>269</sup>.

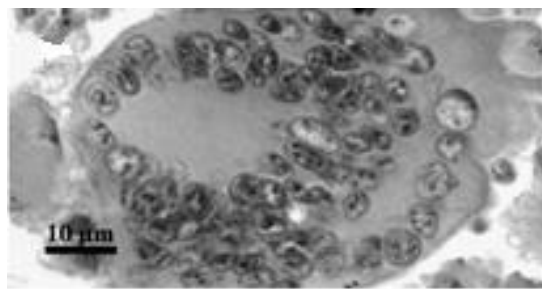
Dans une revue, Zimmermann et Vienken (1982) ont exposé l'intérêt de cette technique par rapport aux techniques de fusion antérieures utilisant des agents chimiques tels que les PEG ou des virus atténués tels que le virus de Sendai<sup>270</sup>. Les problèmes de ces deux anciennes techniques sont une faible efficacité, l'impossibilité de retirer totalement l'agent responsable de la fusion après que celle-ci se soit produite, une grande variabilité de protocoles à appliquer en fonction du type de cellules utilisé, l'impossibilité de créer des cellules géantes de quelques centaines à quelques milliers de noyaux ainsi que la non synchronisation des



événements obligeant à suivre les échantillons pendant une longue période. L'électrofusion a l'avantage de permettre de s'affranchir de tous ces problèmes.

En 1983, Blangero et Teissié ont montré qu'il était possible d'obtenir un rendement de 80% de cellules fusionnées grâce à l'électrofusion et que ce rendement était directement lié à l'intensité de l'impulsion électrique et à sa durée mais qu'il n'était pas lié au nombre de pulses délivrés.

En 2000, Mekid et Mir ont montré qu'il était possible de pratiquer l'électrofusion sur des tissus *in vivo* en appliquant huit impulsions de 100  $\mu$ s et de 50 à 200 kV.m<sup>-1</sup> délivrés à une fréquence d'1 Hz sur des tumeurs de souris (mélanome) *in situ*<sup>271</sup>. Cette technique a résulté en la formation de cellules géantes possédant plusieurs noyaux (jusqu'à 64 noyaux comme montré sur la Figure 46).

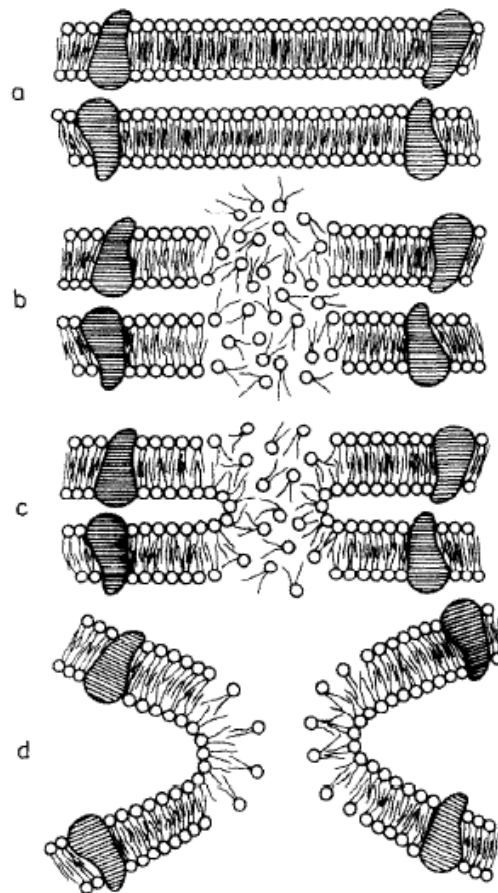


**Figure 46 : Cellule géante possédant 64 noyaux générée par électrofusion de tumeur issue de cellules B16 *in vivo*.** Source : Mekid et Mir (2000)<sup>271</sup>.

Cependant, ce protocole n'a pas permis de générer des fusions dans d'autres tissus comme le foie ou des tumeurs de type fibrosarcome. Il semblerait que la possibilité de fusionner des cellules de tissus *in vivo* dépende de la présence importante ou non de matrice extracellulaire qui s'oppose à la mise en contact des cellules les unes avec les autres.

#### b) Principe

En 1981, L'équipe d'U. Zimmermann a proposé une hypothèse pour le mécanisme de l'électrofusion (Figure 47). Le champ électrique entraîne une perturbation de la membrane et comme les cellules ont été mises en contact grâce à la diélectrophorèse, il y a réarrangement des membranes qui peut entraîner la formation d'un pore membranaire dans la partie lipidique des membranes menant à la fusion de celles-ci.



**Figure 47 : Hypothèse de l'équipe d'U. Zimmermann sur le mécanisme de la fusion en 1981.** Source : Pilwat *et al.* (1981)<sup>266</sup>

Dans ce modèle, les modifications de l'eau interfaciale à proximité des bicouches lipidiques n'ont pas été évoquées. En effet, l'eau interfaciale d'une membrane a un effet répulsif sur l'autre membrane lorsque les cellules sont rapprochées. C'est ce qui empêche deux membranes de fusionner spontanément en l'absence d'agents fusogènes et il faut dépasser cette barrière énergétique pour permettre la fusion des deux membranes voisines. Ces forces sont peut-être diminuées par la déstabilisation de l'eau interfaciale qui se produit lors de l'électropéabilisation des membranes. Cette hypothèse est cohérente avec les données de RMN du Phosphore 31 de Lopez *et al.* qui présentent cette modification possible de l'eau interfaciale au contact des bicouches lipidiques soumises à des impulsions électriques<sup>175</sup>. De plus, cette notion de réarrangement de l'eau interfaciale a aussi été évoquée par l'équipe de T. Vernier dans des travaux de dynamique moléculaire récents (2013). En effet, il a été montré par la simulation *in silico* que les molécules d'eau qui sont des dipôles électriques réagissent très rapidement au champ électrique appliqué en se réorientant ce qui est à l'origine de la formation de pores dans la membrane<sup>164</sup>.

La fusion de deux cellules comprend la fusion des membranes mais aussi la fusion des cytoplasmes. Il a été montré par Blangero *et al.* (1989) que le cytosquelette, et plus

particulièrement les microtubules, était affecté par l'application de champs électriques et était impliqué dans l'agrégation des noyaux dans le polycaryon <sup>272</sup>. Ce mécanisme a aussi été défendu par Zheng *et al.* (1990) <sup>273</sup>. Ces derniers ont aussi évoqué le rôle de l'actine dans la fusion des contenus cellulaires. Cette deuxième étape est bien plus longue que la première. En effet, la fusion des membranes dure quelques minutes alors que la fusion des cytoplasmes a une durée de l'ordre de grandeur de l'heure.

Un des inconvénients de l'électrofusion est qu'il peut être difficile de faire fusionner deux types cellulaires de taille très différente. En effet, les seuils de l'électroperméabilisation de ces cellules sont très différents si l'on prend en compte l'équation de Schwann puisque ce seuil est proportionnel au rayon des cellules. En d'autres termes, les conditions électriques nécessaires pour perméabiliser les cellules de petite taille peuvent entraîner une perméabilisation irréversible des cellules de grosses taille alors que les conditions électriques nécessaires pour perméabiliser les grosses cellules peuvent ne pas perméabiliser les petites.

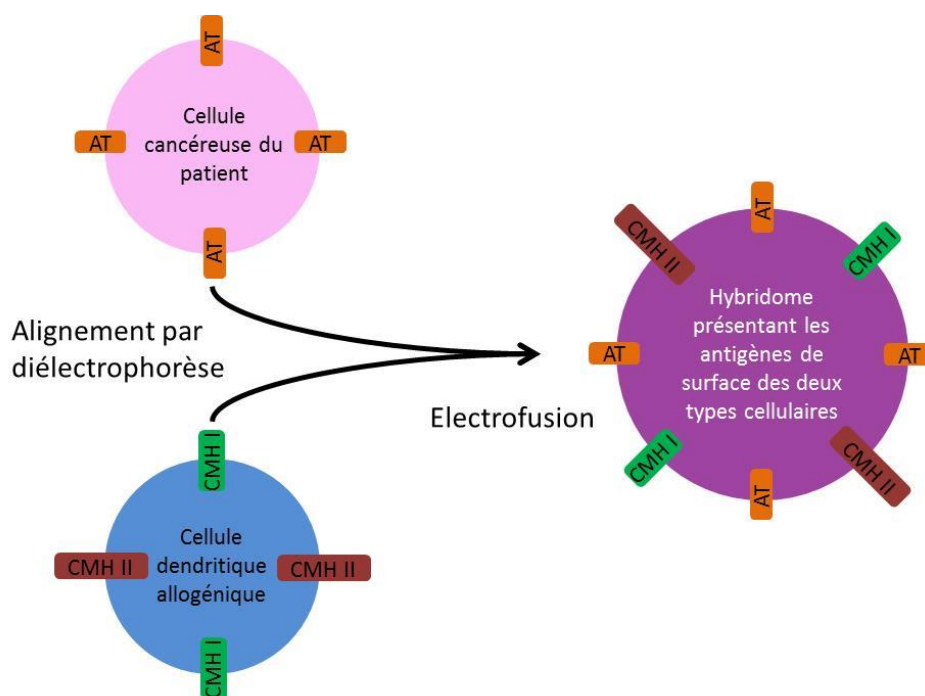
L'électrofusion a été réalisée le plus souvent après que les cellules aient été mises en contact par diélectrophorèse mais il est aussi possible de soumettre les cellules aux impulsions électriques puis de les mettre en contact (par centrifugation par exemple) <sup>274</sup> et d'observer des fusions. Cela est possible car la déstabilisation de la membrane soumise à des impulsions électriques dure quelques minutes. Il peut être intéressant de garder les cellules dans la glace entre ces deux étapes pour ralentir le processus de récupération de la membrane. Cette technique est très intéressante pour fusionner des cellules de tailles différentes puisque les deux types cellulaires peuvent être électroperméabilisés de manière indépendante et par conséquent être soumis à des paramètres électriques différents et optimaux pour chaque type de cellule.

### c) Applications

Les applications principales de la fusion cellulaire sont la production d'anticorps monoclonaux et l'immunothérapie antitumorale utilisant les cellules présentatrices d'antigènes.

Le principe de l'immunothérapie antitumorale utilise le mécanisme de la présentation d'antigènes spécifiques des cellules tumorales par des cellules dendritiques. Les antigènes sont des macromolécules retrouvées dans les organismes vivants et qui peuvent être reconnus par certaines cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes B. Lorsque les antigènes présentés sont reconnus comme des antigènes du non-soi (comme dans le cas des cellules tumorales puisque ces cellules ont des caractéristiques différentes des cellules saines), la réponse immunitaire est activée. L'immunothérapie antitumorale utilise la fusion d'une cellule

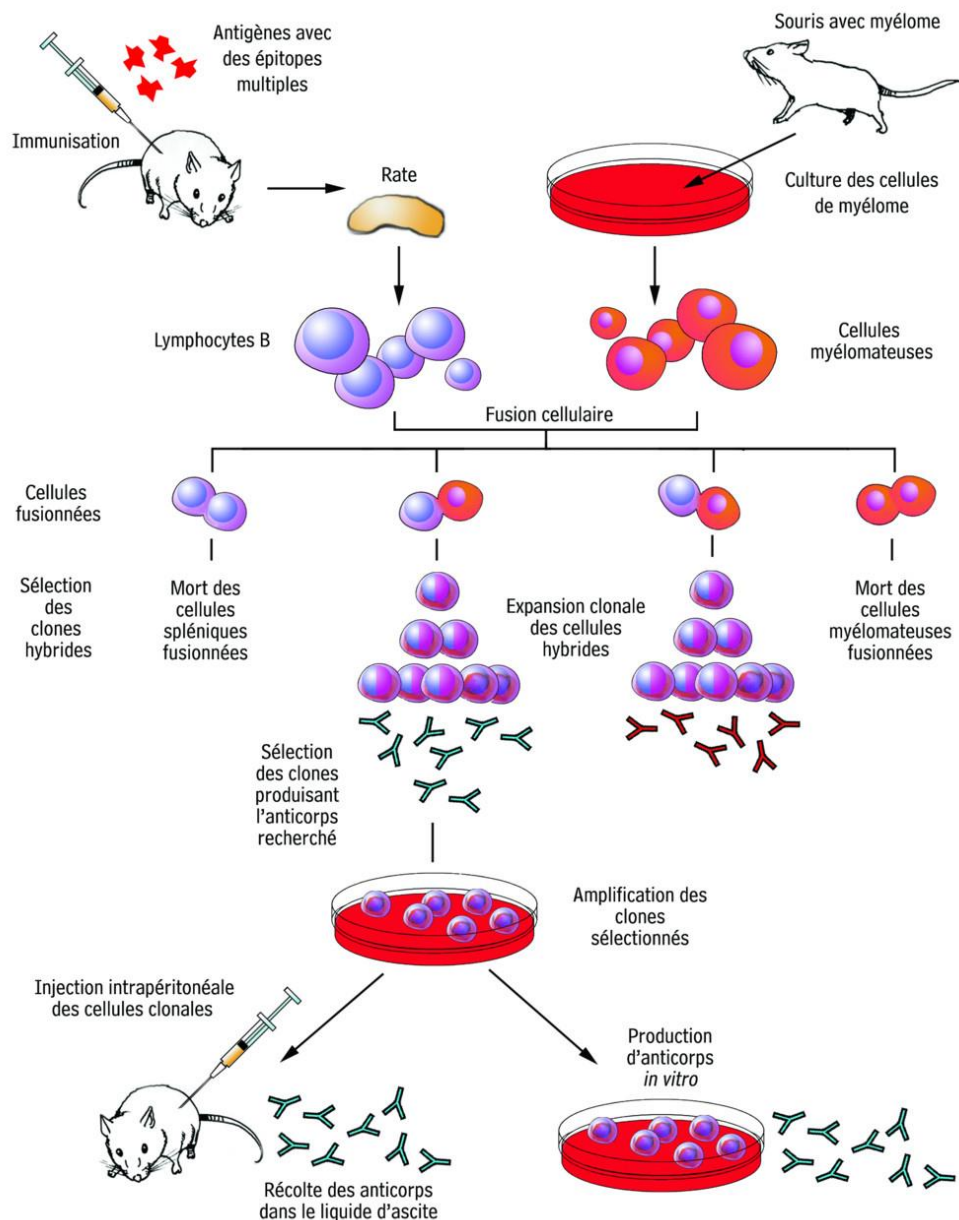
tumorale avec une cellule dendritique. En effet, lorsqu'une cellule subit une mutation et commence à se développer de manière non régulée (début de la cancérogénèse) le système immunitaire est capable de détecter l'amas cellulaire produit et de l'éliminer. En d'autres termes, le système immunitaire lutte continuellement contre des cellules cancéreuses. Cependant, il arrive que les cellules cancéreuses passent entre les mailles du filet et qu'une tumeur se développe car les cellules dégénérantes ne sont pas reconnues par le système immunitaire. L'électrofusion peut être utilisée pour fusionner, d'une part, des cellules irradiées de la tumeur d'un patient (ces cellules ne peuvent plus proliférer) ou des fragments de cellules de la tumeur lysées avec, d'autre part, des cellules dendritiques provenant du même patient ou d'un autre donneur (Figure 48). Il est important d'utiliser des cellules tumorales irradiées ou des lysats de cellules tumorales et non pas des cellules tumorales pouvant se diviser pour éviter que les hybridomes ainsi formés ne prolifèrent, ce qui rendrait la technique peu sûre. Cette technique permet aux cellules dendritiques de jouer leur rôle de présentation des antigènes et de mobiliser le système immunitaire contre les antigènes spécifiques de la tumeur<sup>275, 276</sup>.



**Figure 48 : Electrofusion d'une cellule tumorale de patient et d'une cellule dendritique allogénique dans le cadre de l'immunothérapie anticancéreuse.** AT : Antigène tumoral, CMH I : CMH de classe I, CMH II : CMH de classe II

Cette technique est arrivée jusqu'au stade de l'essai clinique. Cela a été appliqué au traitement de différents types de cancers tels que le cancer métastatique du rein<sup>277, 278</sup> et le mélanome<sup>279</sup>. Ce traitement montre une efficacité moyenne mais celle-ci s'améliore depuis les premiers essais cliniques.

L'électrofusion peut aussi avoir comme application la production d'anticorps monoclonaux. Pour cela, la fusion d'une cellule lymphoïde normale de mammifère (lymphocyte B) avec une cellule tumorale de myélome est réalisée. Après avoir été exposé à un antigène *in vitro*, le lymphocyte B est capable de produire un anticorps monoclonal mais ne peut pas se multiplier et donc ne peut pas être cultivé alors que la cellule tumorale de myélome est immortelle et est capable de se diviser. La fusion de ces deux cellules permet à l'hybridome formé de présenter les propriétés des deux cellules (Figure 49). Les anticorps monoclonaux produits par cette technique sont utilisés pour produire des médicaments utilisés principalement en cancérologie mais aussi en dermatologie ou en neurologie par exemple.



**Figure 49 : Production d'anticorps monoclonaux basée sur un hybridome murin.**  
Source : L'Italien (2008) <sup>280</sup>.

Cette technique a été publiée pour la première fois en 1975 par Köhler et Milstein<sup>281</sup>. Ces travaux utilisant des PEG pour générer la fusion des deux types cellulaires leur ont valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1984. Par la suite, l'électrofusion a été appliquée à la production d'hybridomes par de nombreuses équipes depuis le milieu des années 1980. Les premiers travaux concernaient la production d'hybridomes murins<sup>282</sup> mais pour limiter l'immunogénicité des anticorps ainsi produits il a été intéressant d'appliquer la technique à la production d'hybridomes humains<sup>283, 284</sup> ou d'hybridomes mixtes<sup>285, 286</sup> (les hybridomes totalement humains étant plus difficiles à produire).



### **III. Perméabilisation des membranes cellulaires internes et externes par des impulsions électriques ultracourtes**

#### **A. Les impulsions nanosecondes**

Jusqu'à la fin des années 90, les impulsions électriques utilisées en biologie pour déstabiliser la membrane cellulaire étaient des impulsions d'une durée de quelques centaines de microsecondes à quelques millisecondes et d'une amplitude de champ d'une dizaine de  $\text{kV.m}^{-1}$  à quelques centaines de  $\text{kV.m}^{-1}$ . Les impulsions de quelques dizaines de  $\text{kV.m}^{-1}$  et celles d'amplitude supérieure permettent de perméabiliser la membrane des cellules des êtres vivants pour y faire entrer des molécules à visée thérapeutique telles que des médicaments <sup>59, 68</sup> ou de l'ADN <sup>131, 133</sup> (Cf. II.D.). Ce procédé est appelé électroperméabilisation. Depuis le début des années 2000, de nouvelles impulsions électriques plus courtes et d'amplitudes plus élevées ont été utilisées en biologie : les impulsions nanosecondes. Ces impulsions ont une durée de quelques nanosecondes à quelques centaines de nanosecondes et une amplitude de champ pouvant atteindre  $30 \text{ MV.m}^{-1}$ . Dans le cas des impulsions millisecondes et microsecondes, la membrane plasmique se comporte comme un isolant contrairement au cas des impulsions nanosecondes. Les impulsions nanosecondes sont plus courtes que le temps de charge de la membrane plasmique qui ne se comporte plus comme un isolant. Par conséquent, les impulsions nanosecondes ont la particularité de pouvoir se propager à l'intérieur des cellules et d'affecter les structures cellulaires internes contrairement aux impulsions microsecondes ou millisecondes qui affectent principalement la membrane externe des cellules.

#### **1) Génération des impulsions nanosecondes**

L'utilisation d'impulsions nanosecondes pour manipuler l'intérieur des cellules doit répondre à différents critères :

- Génération d'un champ électrique de l'ordre du  $\text{MV.m}^{-1}$  ou de la dizaine de  $\text{MV.m}^{-1}$ ,
- Génération d'impulsions les plus courtes possibles, d'une durée largement inférieure à une  $\mu\text{s}$ .
- Génération de fronts de montée compatibles avec des durées d'impulsions d'une à quelques centaines de ns.

La majorité des composants électriques conventionnels ne supportent pas des champs électriques de cette intensité ou sont trop lents pour répondre à ces critères. Le choix des



composants se fera donc selon l'utilisation recherchée et ne sera pas le même pour générer des impulsions de très forte tension (plusieurs centaines de kV) et de plusieurs centaines de nanosecondes que pour des impulsions d'une tension plus faible (quelques kV) et de quelques nanosecondes. Ces impulsions sont délivrées dans des systèmes d'exposition où l'espace inter-électrodes varie classiquement de 150  $\mu\text{m}$  à 4 mm<sup>69, 287, 288</sup>.

Les trois éléments des circuits permettant de délivrer des impulsions nanosecondes (générateur, commutateur, système d'exposition) sont détaillés dans la suite de cette partie.

#### a) Générateurs utilisés pour les impulsions nanosecondes

La génération d'ondes électriques impulsionnelles nécessite un stockage de l'énergie électrique pour permettre une libération très rapide de cette énergie dans le dispositif d'exposition de l'échantillon. Le stockage peut être fait soit par un système inductif, soit par un système capacitif. Le stockage inductif permet une gestion précise du courant alors que le stockage capacitif permet de mieux maîtriser la tension. Par ailleurs, les stockages inductifs sont le plus souvent couplés à des commutateurs à ouverture<sup>289, 290</sup> alors que les stockages capacitifs se font avec des commutateurs à fermeture qui offrent plus de degrés de liberté et une mise en œuvre moins délicate. C'est pour ces différentes raisons que les générateurs à impulsions nanosecondes utilisent essentiellement le stockage capacitif.

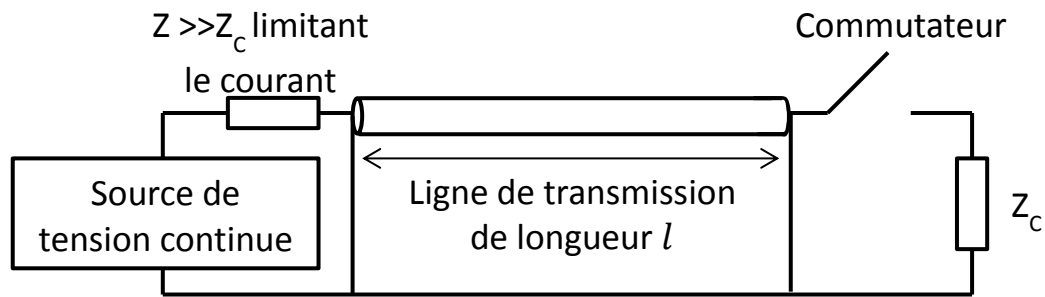
Différents moyens de stocker de l'énergie de manière à générer une libération rapide sont détaillés ci-dessous.

##### i. Générateurs d'impulsions à ligne de transmission

Le circuit le plus classique est le générateur d'impulsions à ligne de transmission (Figure 50). La ligne de transmission est chargée avec une tension  $V_0$  puis à la fermeture du commutateur il y a libération d'une impulsion rectangulaire d'amplitude  $V_0/2$  si l'impédance de l'échantillon est la même que celle de la ligne de transmission<sup>291</sup>. La durée  $D$  de l'impulsion est déterminée par la longueur de la ligne de transmission par :

$$D = 2\tau = \frac{2l\sqrt{\epsilon_r}}{c}$$

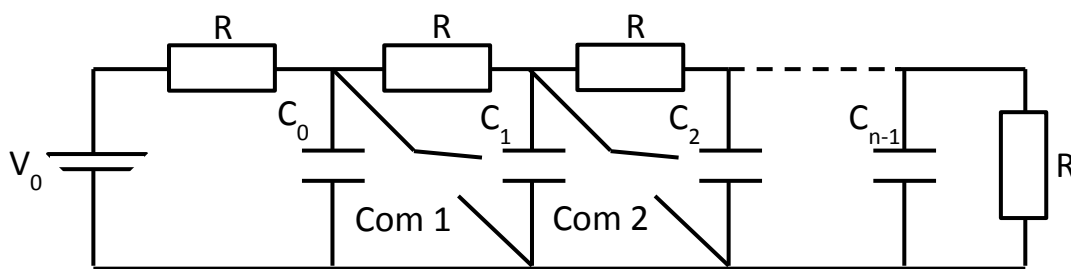
où  $\tau$  est le temps de propagation dans la ligne de transmission,  $\epsilon_r$  est la permittivité relative du diélectrique utilisé dans la ligne de transmission,  $c$  est la vitesse de la lumière dans le vide et  $l$  est la longueur de la ligne de transmission. A titre d'exemple, un câble coaxial de 1 m dont l'isolant est en polyéthylène (permittivité relative  $\epsilon_r=2,25$ ) produira une impulsion de 10 ns. Le plus souvent, les lignes de transmission sont des câbles coaxiaux.



**Figure 50 : Schéma électrique d'un générateur d'impulsion à ligne de transmission.**  $Z$  correspond à l'impédance de la source de tension continue et  $Z_c$  correspond à l'impédance de l'échantillon

### ii. Générateur de Marx

Dans le générateur de Marx,  $n$  condensateurs sont chargés en parallèle avec une tension initiale  $V_0$  puis ils sont déchargés en série, ce qui permet d'obtenir une tension  $n \times V_0$  à la sortie (Figure 51). Lorsque le premier interrupteur se ferme, la tension du premier condensateur est transférée vers le deuxième interrupteur qui se ferme et cela pour chaque condensateur ce qui permet de fermer tous les interrupteurs. Par exemple un générateur de Marx de 14 étages permet d'obtenir une tension de sortie de 250 kV à partir d'une tension initiale de 18 kV <sup>292</sup>. Ce type de générateur est souvent utilisé avec des commutateurs à éclateurs à gaz et ils permettent de générer des tensions très élevées (jusqu'à la centaine de kV).



**Figure 51 : Schéma électrique d'un générateur de Marx**

La fréquence de répétition des impulsions de ce système est limitée car le temps de charge et par conséquent la fréquence de répétition dépendent du nombre d'étages. Un grand nombre d'étages limite la fréquence de répétition à quelques dizaines de Hz <sup>293</sup>. Par ailleurs il est difficile d'avoir une reproductibilité absolue des impulsions générées.

### iii. Générateur Blumlein

Le générateur Blumlein consiste à charger en parallèle deux lignes de transmission identiques (de même impédance) et à les décharger en série. Ce système permet de délivrer une impulsion rectangulaire de tension égale à la tension de polarisation  $V_0$  et de durée  $2\tau$ . La durée de l'impulsion dépend donc de la longueur des lignes de transmission. Le schéma présentant ce circuit est présenté sur la Figure 52.

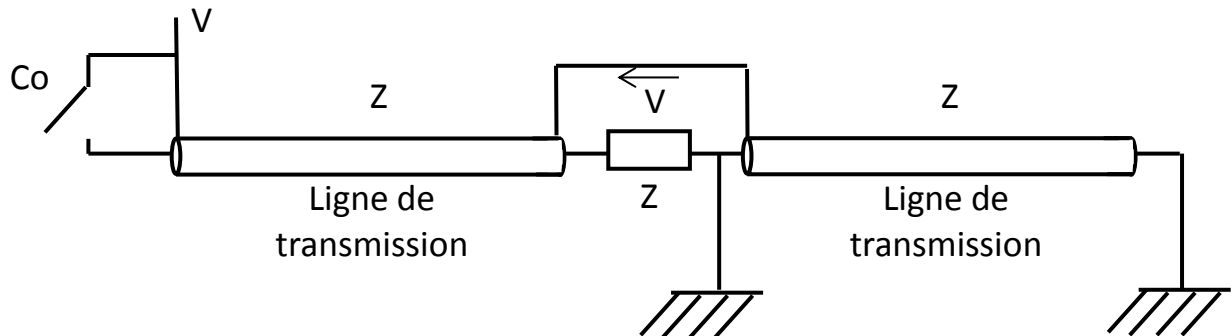


Figure 52 : Schéma électrique du générateur Blumlein

### iv. Transformateurs à lignes de transmission

Les transformateurs à lignes de transmission sont composés de  $n$  lignes de transmission identiques (de même impédance) connectées en parallèle en entrée, et en série en sortie. Il est nécessaire que la charge soit adaptée pour que ce système fonctionne, ce qui est une contrainte qui restreint les domaines d'applications. Ce dispositif permet d'obtenir en sortie une tension  $n \times V_0$ <sup>294</sup>. Par exemple un générateur composé de trois lignes de transmission peut permettre de générer une tension de sortie de 30 kV en utilisant une tension d'entrée de 10 kV<sup>295</sup>.

#### b) Les commutateurs utilisés pour les impulsions nanosecondes

Le commutateur d'un circuit permettant de générer des impulsions nanosecondes est un élément critique de ce circuit. C'est lui qui va imposer la forme de l'impulsion et la fréquence de répétition du signal.

#### i. Les éclateurs

Les éclateurs ont été les premiers commutateurs utilisés pour la génération d'impulsions ultracourtes. Deux électrodes sont séparées par un milieu gazeux et une différence de potentiel croissante est appliquée sur ces deux électrodes. Dans un premier temps le gaz joue un rôle d'isolant jusqu'à ce que sa tension de claquage soit atteinte et que le courant

passé, ce qui correspond à la fermeture de l'interrupteur. La tension que ces commutateurs peuvent supporter dépend de la géométrie des électrodes, de la nature et de la pression du gaz utilisé. Par exemple, si un champ électrique homogène statique est appliqué, la tenue de l'air est de  $3 \text{ MV.m}^{-1}.\text{bar}^{-1}$  alors qu'elle est de  $9 \text{ MV.m}^{-1}.\text{bar}^{-1}$  pour un gaz électronégatif tel que le  $\text{SF}_6$  <sup>296</sup>. Ces commutateurs ont comme avantage de supporter des tensions élevées mais peuvent présenter une forte érosion des électrodes de l'éclateur et une fréquence de répétition faible. En effet, le temps typique pour que la plupart des gaz ionisés tels que l'air, l'azote ou le  $\text{SF}_6$  reviennent à leur état initial est de l'ordre de 10 ms. Cela impose de travailler à une fréquence de répétition inférieure à 100 Hz <sup>297</sup>.

## *ii. Les semi-conducteurs*

Les semi-conducteurs peuvent être classés selon leurs possibilités de commande : certains sont non commandables (diodes), certains sont commandables à la fermeture (thyristors) et d'autres peuvent être commandés à la fois à l'ouverture et à la fermeture (Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor ou MOSFET, Insulated Gate Bipolar Transistor ou IGBT). Certains de ces commutateurs comme les thyristors et les IGBT ont respectivement des temps de commutation de quelques  $\mu\text{s}$  et de quelques centaines de ns ce qui en exclut l'utilisation pour la génération d'impulsions nanosecondes.

Les MOSFET ne permettent pas de résister à des tensions élevées (jusqu'à 1 kV au plus) mais présentent des temps de commutation rapides (temps de montée de 3 ns <sup>298</sup>). Contrairement aux transistors bipolaires, les MOSFET font appel à un seul type de porteurs de charges (ce qui en fait des composés unipolaires).

Il faut noter que les semi-conducteurs peuvent présenter des claquages irréversibles qui altèrent les propriétés des jonctions de ces composants. La tendance technologique pour pallier à ce problème est d'utiliser du matriçage qui permet d'améliorer la résistance au courant lorsque les composants sont disposés en parallèle ou la résistance à la tension lorsque les composants sont disposés en série. Les diodes de type DSRD (Drift Step Recovery Diodes), par exemple, peuvent être utilisées pour générer des impulsions ultracourtes. Le principe consiste en l'injection de charges dans une diode par des impulsions de polarisation qui concentrent la charge près des jonctions de la diode et permettent une décharge rapide. Les DSDR permettent d'obtenir des fronts de montée de l'ordre de la nanoseconde <sup>299</sup>. D'autres types de semi-conducteurs qui résistent à des tensions élevées (supérieures à 10 kV) avec des fronts de montée plus rapides (inférieurs à 1 ns) ont été développés dans les dernières années <sup>300</sup>.

### iii. Les photoconducteurs

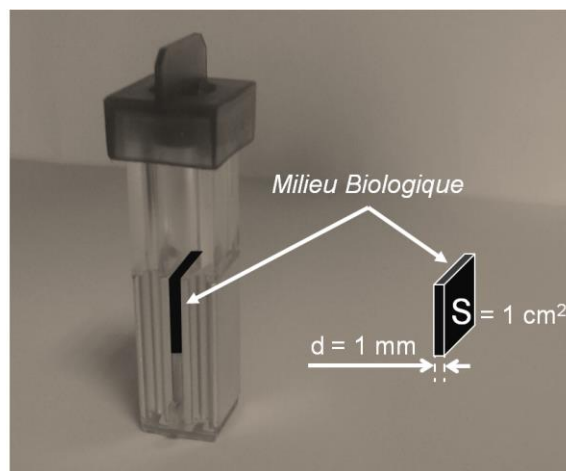
Les photoconducteurs sont des composants optoélectroniques dont les propriétés isolantes peuvent changer si le composant est exposé à un signal lumineux intense de type laser<sup>301, 302</sup>. Les photoconducteurs en arséniure de gallium (GaAs), activés par des lasers, correspondent à une nouvelle génération d'éclateurs. Ils sont utilisés pour des signaux très rapides. L'illumination extrêmement brève crée des porteurs de charges, ce qui permet au courant de circuler et rend conducteur le matériau alors qu'il était isolant avant l'excitation lumineuse.

## 2) Les systèmes d'exposition pour les impulsions nanosecondes

### a) Les électrodes à plaques parallèles

#### i. Les cuvettes

Les cuvettes d'électroporation sont des cuvettes en plastique avec deux plaques métalliques parallèles en contact avec la solution contenue à l'intérieur des cuvettes. Elles permettent d'appliquer les impulsions électriques sur un grand nombre de cellules en suspension dans leur milieu de culture ou dans toute autre solution présentant un intérêt pour l'expérience. Leur impédance est définie par la géométrie des électrodes et par la conductivité de la solution entre les électrodes. Ce sont des dispositifs commerciaux qui existent avec des espaces inter-électrodes constants de 1 mm, 2 mm ou 4 mm (une cuvette 1 mm est présentée en Figure 53).



**Figure 53 : Cuvette d'électroporation classique<sup>303</sup> (image utilisée avec l'autorisation d'Aude Silve)**

Les électrodes des cuvettes sont en aluminium dont la surface est polie pour limiter la création d'arcs électriques. Ce système d'exposition présente l'avantage de permettre de travailler en conditions stériles. Cela permet donc de récupérer les cellules après l'application des impulsions électriques et de les suivre dans le temps pour comprendre l'effet à moyen et à long terme de ces impulsions. Cependant, il n'est pas possible d'observer les cellules au microscope pendant l'application du champ électrique et pendant la minute qui suit.

#### ii. Les électrodes à plaques parallèles utilisées *in vivo*

Pour les expériences *in vivo*, il est possible d'utiliser des électrodes composées par deux plaques de métal parallèles espacées de 1 à quelques millimètres. Ces électrodes sont utilisées pour appliquer les impulsions nanosecondes sur un pli de tissu sain ou sur une tumeur ou encore pour traiter un organe interne partiel ou entier si la technique est associée à de la chirurgie.

### b) Les électrodes à aiguilles

#### i. Les électrodes utilisées *in vitro*

Il est possible d'exposer un petit nombre de cellules aux impulsions nanosecondes tout en les observant sous le microscope en utilisant des électrodes à aiguilles parallèles que l'on dispose de part et d'autre des cellules à traiter. Un exemple de ces électrodes est décrit par Pakhomov *et al* (2007)<sup>288</sup>. Ces auteurs utilisent des électrodes de tungstène de 0,125 mm de diamètre séparées par 0,31 mm et branchées en parallèle sur une ligne Blumlein (Figure 54).

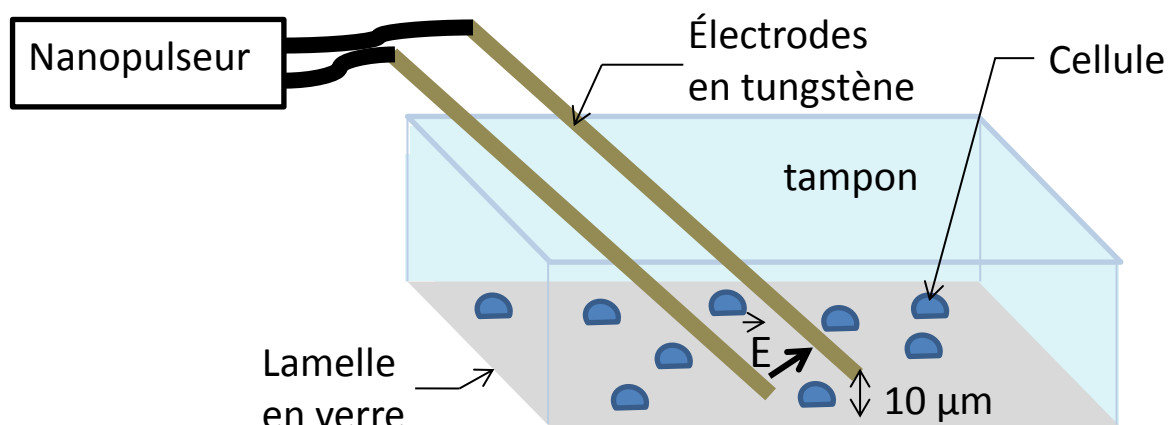


Figure 54 : Electrodes à aiguilles

Le fait d'utiliser des électrodes plus proches l'une de l'autre que celles des cuvettes permet d'obtenir des champs électriques plus élevés en utilisant les mêmes générateurs. Ce type de dispositif étant fabriqué à façon par chaque équipe de recherche, différents types de matériaux peuvent être utilisés pour les électrodes comme par exemple le tungstène, l'acier inoxydable, le platine, l'or, etc. Les électrodes sont déplacées avec un micromanipulateur qui permet de contrôler leur position au micron près.

### *ii. Les électrodes utilisées in vivo*

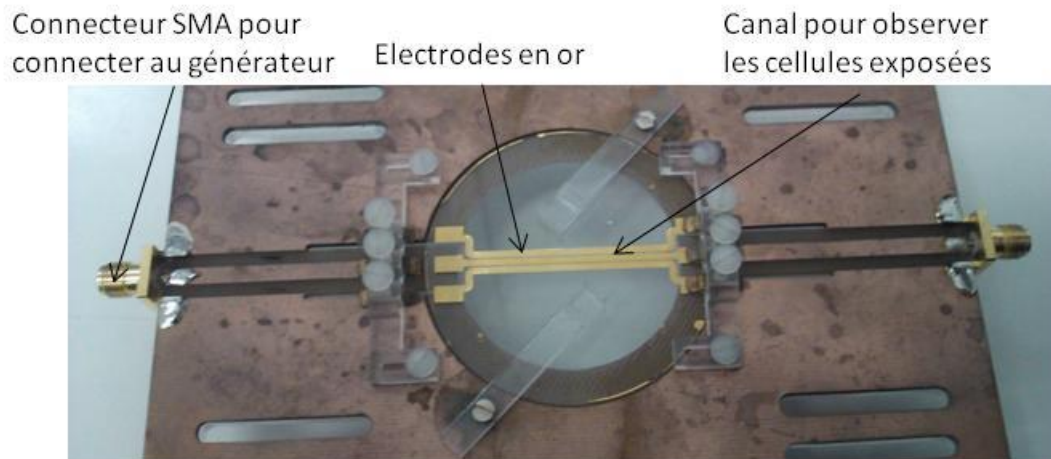
Dans certaines études *in vivo*, les électrodes utilisées sont des électrodes avec deux ou plusieurs aiguilles qui sont introduites dans l'animal de manière à ce que le tissu à traiter soit entre les électrodes. Il est possible d'isoler les électrodes sur une partie de leur longueur pour que le champ électrique ne soit appliqué qu'aux extrémités et donc sur une zone très ciblée<sup>304, 305</sup>.

### *c) Les microdispositifs*

Les microdispositifs permettent d'allier certains avantages des cuvettes et des électrodes à aiguilles puisqu'ils permettent de traiter un plus grand nombre de cellules qu'entre les électrodes à aiguilles tout en permettant une observation simultanée des cellules au microscope. Comme les électrodes à aiguilles, les microdispositifs sont développés par les équipes de recherche. Il existe différents types de microdispositifs. Par exemple, un tel système peut être composé par deux électrodes planaires d'or de 25  $\mu\text{m}$  déposées par électrodépôt sur un substrat en quartz (Figure 55). Les électrodes définissent un canal de 150 ou 300  $\mu\text{m}$  (selon les modèles)<sup>287</sup>. Ici la miniaturisation permet encore de rapprocher les électrodes de manière à augmenter le champ électrique auquel est exposé l'échantillon.

Le dispositif a une géométrie qui permet d'avoir une impédance de 50  $\Omega$  au niveau du système d'exposition (lorsque l'on utilise du milieu de culture de cellules classique de conductivité 1,5  $\text{S.m}^{-1}$ ) et il peut résister à plusieurs kV (jusqu'à au moins 10 kV). Il est aussi utilisable sous le microscope et peut être associé à un dispositif de micro-fluidique qui permet de contrôler le mouvement des cellules en suspension.

Comme pour les électrodes à aiguilles, différents types de matériaux peuvent être utilisés pour les électrodes.



**Figure 55 : Exemple d'un microdispositif permettant d'exposer des cellules aux impulsions nanosecondes sous le microscope**

#### d) Importance du métal utilisé à l'interface électrode/échantillon

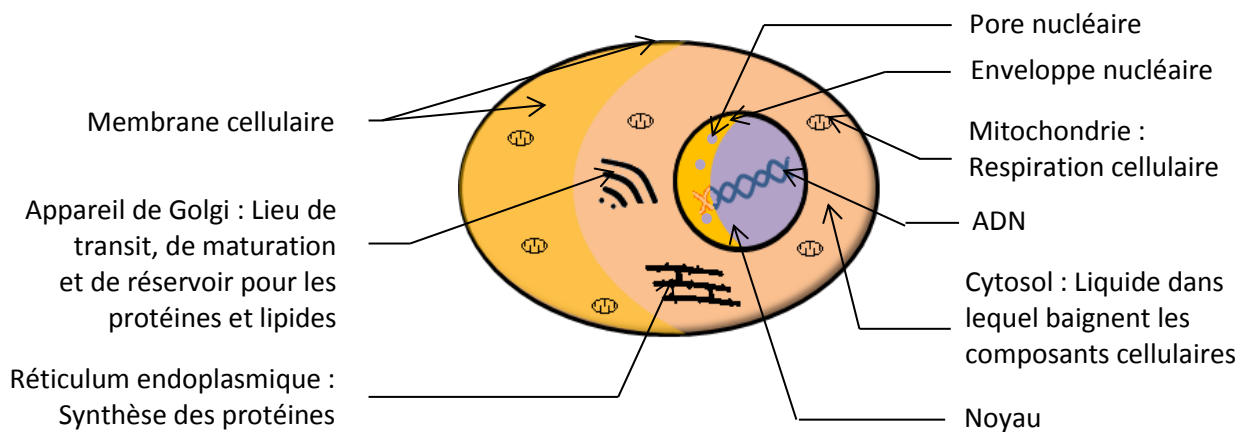
Il est important de noter que le matériau utilisé pour les électrodes doit être choisi avec soin. En effet, il est fréquent d'avoir un relargage de particules dans la solution à l'interface entre les électrodes et l'échantillon suite à l'application du champ électrique<sup>306, 307, 308</sup>. Il faut donc éviter les matériaux qui rejettent des particules toxiques ou des particules qui peuvent interférer avec les systèmes biologiques. On peut noter que lorsque le cuivre est exposé à des impulsions électriques il peut relarguer des ions cuivre qui ont un effet toxique sur les cellules. L'or ou le platine sont des matériaux qui ne présentent pas de toxicité cellulaire induite par la solubilisation d'ions métalliques mais leur coût est bien supérieur à celui du cuivre.

### 3) Effets des impulsions nanosecondes sur l'intérieur des cellules et sur la membrane plasmique

A l'intérieur de la cellule, on trouve différents types d'organites qui sont dans le milieu intracellulaire appelé cytosol. Les organites sont isolés du cytosol par une ou deux membranes phospholipidiques. Les différents organites ont des structures et des rôles spécialisés. La mitochondrie est le lieu de la respiration cellulaire (Figure 56) où l'énergie apportée par l'alimentation est transformée en énergie utilisable par la cellule sous forme d'ATP. La mitochondrie est un organite entouré par deux membranes (enveloppe). L'espace inter membranaire contient des molécules telles que Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ou le cytochrome c qui sont impliquées dans la mort cellulaire programmée (apoptose) lorsqu'elles sont libérées dans le cytoplasme suite à un stimulus approprié.



Le noyau est l'organe qui contient l'ADN et donc l'information génétique de la cellule. Le noyau est aussi un organe à enveloppe. Cependant, l'enveloppe nucléaire a la particularité d'être composée de deux membranes, d'une armature de protéines (les lamines), le tout étant traversé par des pores nucléaires.



**Figure 56 : La cellule eucaryote**

Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont des organites à simple membrane qui ont une structure en saccules. Le réticulum endoplasmique est impliqué dans la synthèse des protéines et des lipides ainsi que dans le stockage du calcium intracellulaire. L'appareil de Golgi sert de lieu de transit pour les protéines et les lipides synthétisés dans le réticulum endoplasmique. L'appareil de Golgi a un rôle essentiel dans la maturation des protéines.

Toutes les membranes cellulaires sont des filtres sélectifs qui ne laissent passer que certaines molécules. La sélectivité de ces filtres dépend de la composition de la membrane. Plus précisément, cette sélectivité dépend de la composition en lipides de la membrane, puisqu'ils peuvent laisser passer certaines molécules par diffusion simple (surtout les petites molécules non chargées), et de la composition en protéines de la membrane, puisqu'elles peuvent agir comme des transporteurs pour des ions et pour des molécules plus grosses chargées ou non. Or, toutes les membranes ne sont pas identiques. En effet, il existe une variabilité dans la composition des membranes d'un type cellulaire à un autre ou d'un organisme à un autre. De plus, il existe aussi des différences entre les membranes de différents organites au sein de la même cellule. Par conséquent, les molécules pouvant traverser les membranes diffèrent en fonction du type de membrane (membrane de mitochondrie, membrane plasmique, etc.), du type cellulaire et de l'organisme dont vient la cellule (Cf. I. A. 4) b) iii.).

La sélectivité de ces membranes entraîne donc une différence de composition entre les solutions de part et d'autre de ces filtres qui est à l'origine d'une différence de potentiel locale au niveau des membranes. Cette différence de potentiel transmembranaire est

indispensable à de nombreux phénomènes cellulaires tels que la contraction musculaire ou la propagation du message nerveux le long des neurones. Chaque type cellulaire et chaque type d'organite cellulaire possède donc un potentiel de membrane (Cf. I. A. 5).

#### a) Effets des impulsions nanosecondes sur la mitochondrie

Il a été rapporté que l'application d'impulsions nanosecondes sur des cellules peut engendrer une baisse de la différence de potentiel de membrane de la mitochondrie et une perméabilisation des membranes de la mitochondrie<sup>309, 310</sup>. Cela montre que les impulsions nanosecondes affectent les organites contrairement aux impulsions classiques de l'ordre de la milliseconde ou de la centaine de microsecondes qui n'affectent que la membrane plasmique.

L'application d'impulsions nanosecondes sur les cellules entraîne l'apoptose. La mitochondrie est fortement impliquée dans le mécanisme de l'apoptose car elle contient des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques et un équilibre existe entre ces facteurs dans le cas d'une cellule saine non stimulée. Il a été montré que Bcl-2, une molécule qui a un effet anti-apoptotique lorsqu'elle est dans la mitochondrie, est libérée après l'application de nombreuses impulsions nanosecondes (300 impulsions de  $4 \text{ MV.m}^{-1}$ , 300 ns, 0,5 Hz) *in vivo* sur des mélanomes de souris<sup>305</sup>. La libération de cette molécule dans le cytoplasme change l'équilibre entre les facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques au sein de la mitochondrie menant au mécanisme d'apoptose.

#### b) Effets des impulsions nanosecondes sur l'ADN contenu dans le noyau

Les travaux de Romeo *et al* rapportent que le profil de migration électrophorétique de l'ADN est changé après l'application d'une impulsion de 60 ns (de 1 à  $2,5 \text{ MV.m}^{-1}$ )<sup>311</sup>. Cela pourrait être dû à la formation d'agrégats d'ADN et à un changement de conformation des nucléoprotéines. Cela montre que les impulsions nanosecondes ont un effet sur l'ADN contenu dans le noyau. Cet effet est réversible car si le test de migration électrophorétique de l'ADN est fait 60 min après l'exposition aux impulsions nanosecondes, il n'y a plus de différences significatives entre les cellules traitées et les cellules non traitées. De plus, la viabilité des cellules n'est pas affectée par ce traitement.

Par ailleurs, Stacey *et al*, ont mis en évidence que l'application de cinq impulsions nanosecondes de 60 ns à  $6 \text{ MV.m}^{-1}$  *in vitro* peut entraîner des dommages dans l'ADN<sup>312</sup>.

### c) Effets des impulsions nanosecondes sur le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique possède plusieurs rôles cellulaires et l'un d'eux est de stocker le calcium à l'intérieur de ses saccules. Par conséquent, la concentration en calcium à l'intérieur du réticulum est plus importante que dans le cytoplasme (60-400  $\mu\text{M}$ <sup>313</sup> dans le réticulum et 0,1  $\mu\text{M}$  dans le cytoplasme<sup>314</sup>). Il est donc possible d'étudier la perméabilisation du réticulum endoplasmique en suivant les flux de calcium entre les vésicules du réticulum endoplasmique et le cytoplasme. Par ailleurs, la concentration intracellulaire du calcium est un paramètre très contrôlé par la cellule puisque le calcium est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires comme par exemple l'apoptose.

Vernier *et al* (2003) ont démontré qu'il est possible de perméabiliser le réticulum endoplasmique en appliquant 10 impulsions de 2,5  $\text{MV.m}^{-1}$  et 30 ns à 4 Hz<sup>315</sup>. Il est donc possible de micromanipuler la concentration de calcium cytoplasmique grâce aux impulsions nanosecondes.

### d) Effet des impulsions nanosecondes sur la membrane plasmique

Il a été supposé pendant plusieurs années que les impulsions nanosecondes ne perméabilisaient pas la membrane plasmique car la durée de l'impulsion était plus courte que le temps de charge de la membrane. Cependant, certains travaux de ces dernières années prouvent que de petites et moyennes molécules comme le Yo-Pro et l'ion Thallium (qui ne peut pas traverser spontanément la membrane plasmique) peuvent traverser la membrane plasmique suite à l'application de respectivement 30 impulsions de 4 ns et de plus de 6  $\text{MV/m}$ <sup>66</sup> et d'une impulsion nanoseconde de 600 ns et de 10-20  $\text{MV.m}^{-1}$ <sup>58</sup>. Cet ion a comme masse moléculaire 204,4  $\text{g.mol}^{-1}$ . De plus, il a été montré qu'une impulsion de 10 ns et de 4  $\text{MV.m}^{-1}$  pouvait permettre l'entrée d'une molécule de plus grande taille considérée comme une molécule de taille moyenne, la bléomycine<sup>69</sup>. Cette molécule est un antibiotique pseudo-peptidique d'environ 1500  $\text{g.mol}^{-1}$  qui a des propriétés anticancéreuses dues à sa capacité à induire des coupures double brin de l'ADN. L'entrée de Yo-Pro a aussi été observée

L'externalisation des PtdSer a été observée immédiatement après l'application de 50 impulsions de 7 ns et 2,5  $\text{MV.m}^{-1}$  à 20 Hz<sup>315</sup>. Les PtdSer sont des lipides que l'on retrouve dans la membrane plasmique mais très majoritairement dans le feuillet interne. Lorsque les membranes sont exposées à des champs électriques tels que les impulsions nanosecondes, il y a perturbation de la membrane. Il est alors possible qu'un réarrangement local de la membrane se produise et qu'il y ait translocation de parties du feuillet interne de la

membrane plasmique vers l'extérieur de celle-ci. Ce phénomène est aussi retrouvé dans les phases précoces de l'apoptose. Même si l'initiation du phénomène d'externalisation des PtdSer due à l'application d'impulsions électriques est différente de l'initiation de l'apoptose classique, il peut y avoir un lien entre l'induction de l'externalisation des PtdSer et l'entrée en apoptose des cellules traitées.

#### 4) Applications biologiques et perspectives thérapeutiques

##### a) Traitement de mélanomes chez la souris

Les travaux de Nuccitelli *et al* ont montré qu'il était possible de faire réduire, voire de faire disparaître, des tumeurs de mélanome chez la souris par l'application d'un grand nombre d'impulsions nanosecondes de 100 ns (2000 impulsions) d'amplitude de champ de  $3 \text{ MV.m}^{-1}$  appliqués à 0,1-0,2 Hz. L'application de ces trains d'impulsions entraîne un échauffement thermique faible qui n'est pas à l'origine de l'effet biologique (les paramètres des impulsions ont été optimisés pour que le tissu ne dépasse pas les  $40^{\circ}\text{C}$  au niveau de la zone traitée)<sup>305</sup>. La rémission de ces tumeurs est due à l'activité apoptotique des impulsions nanosecondes contrairement aux techniques utilisant l'ablathermie pour détruire les tissus cancéreux qui impliquent une nécrose des tissus et par conséquent des cicatrices. Cette technique a donc l'avantage de ne pas laisser de cicatrice.

Par ailleurs, d'autres travaux *in vivo* ont été décrit par Yin *et al* (2012), Dans ces travaux, des tumeurs d'un autre type de cancer de la peau (cancer basocellulaire provenant de cellules non pigmentaires) ont été induites dans un modèle de souris et l'application d'un traitement utilisant des impulsions de 14 ns (50, 200 ou 400 impulsions,  $3,1$  ou  $4 \text{ MV.m}^{-1}$ , 50 Hz) a permis d'éliminer 85 % des tumeurs traitées (33/39 tumeurs). L'application d'un deuxième traitement a permis de faire disparaître les 15 % de lésions restantes. Le même traitement utilisant des impulsions de 7 ns est d'une efficacité moindre car seulement 13,5% des tumeurs traitées (37 tumeurs) ont été éradiquées montrant que l'effet thérapeutique dépend des paramètres des impulsions électriques employées<sup>316</sup>.

##### b) Traitement de cellules cancéreuses humaines *in vitro* et *in vivo*

En 2007, une étude rapportant l'effet des impulsions nanosecondes sur 16 lignées cellulaires humaines *in vitro* a été publiée<sup>317</sup>. 200 impulsions de 20 ns et d'amplitude de  $2,5$  ou  $3,5 \text{ MV.m}^{-1}$  (20 Hz) ont été utilisées et ont montré une forte réduction de la viabilité cellulaire des cellules traitées ainsi que des différences de sensibilité entre les types cellulaires. Le

traitement utilisant le champ électrique le plus fort ( $3,5 \text{ MV.m}^{-1}$ ) est le plus efficace pour générer une grande mortalité cellulaire<sup>317</sup>.

Les travaux de Yin *et al* (2012) rapportent aussi l'activité d'un traitement utilisant les impulsions nanosecondes sur 12 lignées cellulaires de cancers humains *in vitro*. Une série de 50, 200 et 400 impulsions de 7, 14 ou 30 ns et de 3,1 ou 4  $\text{MV.m}^{-1}$  a été appliquée à 50 Hz sur ces lignées cellulaires. Ces traitements ont permis d'observer l'induction d'une mort cellulaire pour toutes les lignées avec une variabilité dans l'amplitude de la tension et le nombre d'impulsions nécessaires pour tuer 50% des cellules exposées<sup>316</sup>.

Il n'existe qu'un cas rapporté d'application d'impulsions nanosecondes sur un humain. Un chercheur ayant développé un cancer basocellulaire de la peau a été traité par un traitement de 200 impulsions électriques de 20 ns ce qui a conduit à une rémission complète du nodule traité validée par une étude histologique de la zone traitée<sup>317</sup>.

## 5) Conclusion

Le développement de générateurs à impulsions nanosecondes a été un enjeu technique durant les dix dernières années mais il est maintenant possible d'étudier l'effet d'impulsions très courtes (quelques nanosecondes) et d'amplitude de champ très élevée (quelques kV à quelques dizaines de kV) sur les cellules ou les tissus *in vitro* ou *in vivo*.

Ces impulsions, dont la durée est plus courte que le temps de charge des membranes plasmiques des cellules, permettent d'affecter les membranes des organites cellulaires et peuvent entraîner la perméabilisation des mitochondries, l'apoptose et la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique ainsi que la dégradation de l'ADN nucléaire. Les impulsions nanosecondes affectent aussi la membrane plasmique des cellules en la rendant temporairement perméable et en induisant l'externalisation des phosphatidylsérines. Pour finir, le potentiel thérapeutique des impulsions nanosecondes a été prouvé *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux et humains. Cependant, il y a une grande disparité dans les traitements appliqués (nombre d'impulsions, amplitude, durée des impulsions, fréquence) et il reste encore à valider l'innocuité et l'efficacité de ce type de traitements dans le cadre d'essais précliniques et cliniques définissant les paramètres optimaux à utiliser selon les types de tumeurs.

## **B. Application des nanopulses : la génération de pics calciques**

### **1) Méthodes de détection**

#### **a) Les marqueurs classique du calcium**

Les modifications de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique peuvent être suivies grâce à des marqueurs fluorescents dont les couleurs et les constantes de dissociation diffèrent (Tableau 6).

**Tableau 6 : Propriétés de différents marqueurs calciques chimiques.** D'après Paredes *et al.* (2008)<sup>318</sup>

Indicateur	Kd pour $\text{Ca}^{2+}$ (nM)	Excitation (nm)/ émission (nm)	Notes
Calcium Green-1	190	490 ex/ 531 em	Longueur d'onde unique
Fluo-3	325	506 ex/ 526 em	Longueur d'onde unique
Fluo-4	345	494 ex/ 516 em	Longueur d'onde unique
Fura-2	145	363/335 ex/ 512 em	Double excitation ratiométrique / simple émission
Indo-1	230	488 ex/ 405/485 em	Simple excitation / double émission ratiométrique
Oregon Green 488 Bapta-1	170	488 ex/ 520 em	Longueur d'onde unique
Fura-4F	0,77	336/366 ex/ 511 em	Double excitation ratiométrique / simple émission
Fura-5F	0,40	336/363 ex/ 512 em	Double excitation ratiométrique / simple émission
Calcium Crimson	185	590 ex/ 615 em	Longueur d'onde unique
X-rhod-1	0,7	580 ex/ 602 em	Longueur d'onde unique

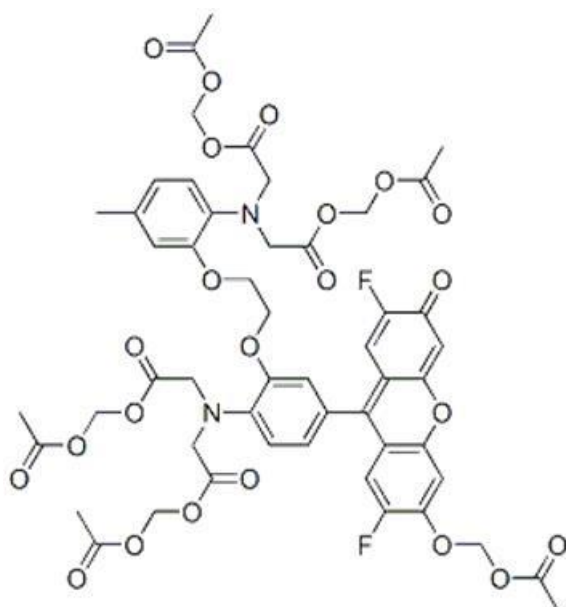
Le choix d'un marqueur doit se faire en fonction du type d'expérience à réaliser mais aussi de l'équipement disponible pour acquérir les images. Après avoir été calibrés, les marqueurs ratiométriques permettent d'obtenir la concentration calcique de la cellule étudiée mais demandent un système d'acquisition plus compliqué que les marqueurs à longueur d'onde unique. En effet, il faudra une roue à filtres mécanisée et rapide (pour l'excitation ou pour l'émission selon le marqueur) pour pouvoir travailler avec ces marqueurs ratiométriques. Les

marqueurs à simple longueur d'onde d'excitation et simple longueur d'onde d'émission sont plus simples à utiliser mais ne permettent pas d'extrapoler les concentrations calciques dans les cellules étudiées. Pour finir, les constantes de dissociation sont à choisir en fonction des concentrations de calcium de travail.

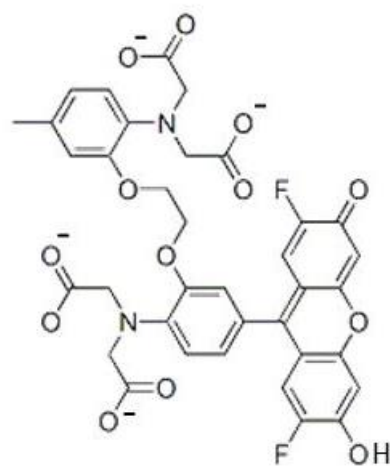
b) Un exemple de marqueur fluorescent du calcium : le Fluo-4

Le Fluo-4 est une version améliorée du Fluo-3. En effet, le Fluo-4 présente une fluorescence plus importante que le Fluo-3 avec un bruit de fond moins important ce qui en fait un marqueur très intéressant. Ce marqueur existe sous une forme perméable aux cellules : Fluo-4 AM (Figure 57). Cette molécule contient 5 groupements AM qui lui permettent de traverser la membrane plasmique.

A.



B.



**Figure 57 : Différentes formes du Fluo-4. A. : Fluo-4 avec les groupements AM. B. : Fluo-4 après coupure des liaisons ester.**

Une fois dans le cytoplasme, ces groupements sont retirés par l'action des estérases contenues dans la cellule. La molécule de Fluo-4 (Figure 57) est ainsi activée et piégée dans la cellule. Cette molécule est dite intensimétrique car sa fluorescence varie en fonction de la concentration de calcium environnante. Cette molécule a pour caractéristiques de fluorescence :  $\lambda_{\text{ex max}} = 494 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{em max}} = 506 \text{ nm}$ .

## 2) Les oscillations calciques spontanées

### a) Le phénomène physiologique

Les cellules dites excitables (telles que les cellules musculaires ou neuronales) sont capables de présenter des pics calciques plus ou moins réguliers mais le terme d'oscillations calciques spontanées est plutôt réservé aux cellules non excitables. En effet, certaines cellules telles que l'oocyte activé (qui après le contact avec le spermatozoïde présente des oscillations calciques pendant plusieurs heures <sup>319</sup> ou les cellules souches mésenchymateuses sont capables d'oscillations calciques spontanées. Il existe deux grands types de formes d'oscillations calciques : les oscillations sinusoïdales et les pics qui s'ajoutent à une ligne de base constante. Les mécanismes impliqués dans les deux formes d'oscillations peuvent différer. Les oscillations sinusoïdales sont les seules qui sont des oscillations au sens propre. Cependant, le terme oscillations est aussi utilisé en biologie pour le deuxième type de profils calciques.

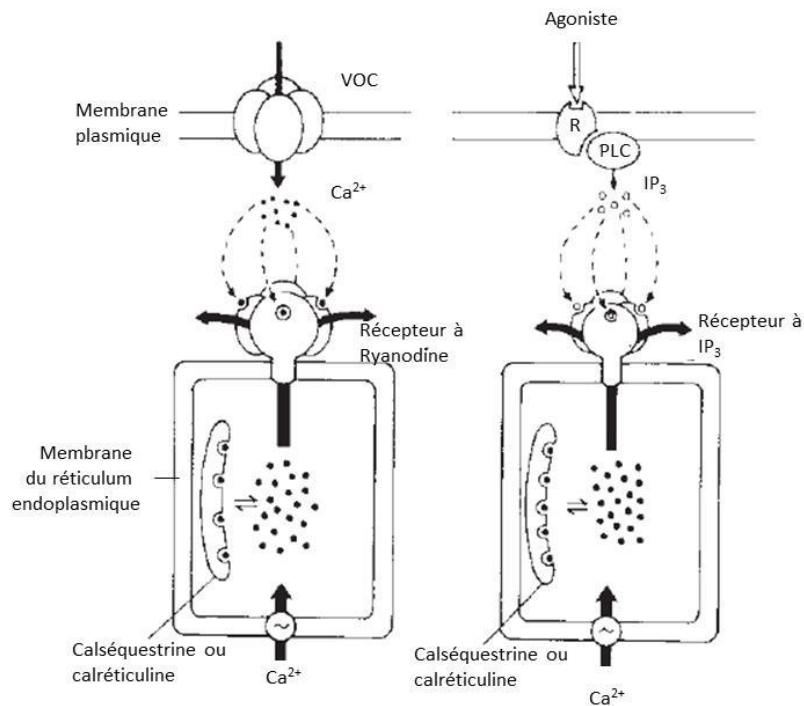
Les oscillations calciques sont le plus souvent des conséquences de stimuli physiques ou chimiques. Les stimuli physiques peuvent être la fertilisation de l'oocyte ou l'étalement cellulaire chez les macrophages, par exemple. Les stimuli chimiques peuvent être réalisés par différentes molécules telle que la vasopressine (qui génère des oscillations calciques chez les hépatocytes de rat <sup>320</sup>) ou l'histamine (qui stimule les cellules endothéliales <sup>321</sup>). La forme et la fréquence de ces oscillations varie en fonction des types cellulaires, de l'intensité du stimulus ou du type de stimulus <sup>322</sup>.

Lors de l'action de stimuli chimiques induits par des molécules hydrophiles le message est le plus souvent capté par une protéine membranaire couplée à une protéine G (Cf. I. A. 4) b) i). La fixation du ligand à l'origine du stimulus sur cette protéine membranaire entraîne l'activation de la phospholipase C qui va cliver le PtdIns 4-5 bisphosphate (PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacyl glycérol (DAG) (Figure 58). L'IP<sub>3</sub> est un second messenger qui va permettre le relargage de calcium depuis les saccules du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire d'une protéine retrouvée sur la membrane de cet organite : le récepteur à IP<sub>3</sub>. Ce récepteur peut fixer l'IP<sub>3</sub>, ce qui a pour conséquence de changer la conformation du récepteur et d'entraîner l'ouverture du canal calcique associé à ce récepteur. Il y a donc fuite du Ca<sup>2+</sup> vers le cytoplasme et donc génération d'un pic calcique cytosolique <sup>323</sup>.

Il existe un autre canal présent sur la membrane du réticulum endoplasmique pouvant être à l'origine du relargage cytosolique du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique : les récepteurs à Ryanodine (RYR). Ces récepteurs ont de nombreuses ressemblances morphologiques avec les IP<sub>3</sub>R. Cependant, ils ne répondent pas à la fixation de l'IP<sub>3</sub> mais ils sont sensibles à l'augmentation du calcium cytosolique. Ces canaux sont impliqués dans le



mécanisme de « Calcium Induced, Calcium release » (CICR). En effet, le mécanisme de CICR correspond au relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum endoplasmique en réponse à une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Le plus souvent, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  initiant le CICR se fait à travers les canaux calciques voltage dépendant (VOC ou Voltage Operated Channels en anglais en réponse à un stimulus électrique) comme présenté sur la Figure 1Figure 58. Ce mécanisme est primordial dans la contraction musculaire mais il est aussi retrouvé dans les cellule-œufs de souris ou dans les cellules acineuses pancréatiques<sup>323</sup>.



**Figure 58 : Différents modèles de stimulus entraînant le relargage cytosolique du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique. D'après Berridge (1993)<sup>323</sup>**

b) Oscillations calciques spontanées dans un type cellulaire *in vitro*, les hMSC

i. Les hMSC, des cellules adultes dérivées du mésoderme pouvant se différencier en plusieurs types cellulaires

Les cellules souches mésenchymateuses humaines (human MSC ou hMSC) sont des cellules souches à la forme fibroblastique que l'on retrouve chez l'enfant et l'adulte.

Ces cellules ont la particularité de pouvoir se différencier en différents types cellulaires tels que les adipocytes, les chondrocytes et les ostéocytes<sup>324, 325</sup> ce qui en fait un outil très intéressant dans le domaine de la régénération tissulaire. De plus, il a été montré que ces cellules ont aussi des propriétés immunosuppressives<sup>326</sup> ce qui en fait aussi un candidat prometteur pour la thérapie cellulaire.

Le nom de cellules souches mésenchymateuses vient du fait que dans un premier temps, les chercheurs pensaient que ces cellules ne pouvaient se différencier qu'en cellules dérivées du mésoderme (ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes, ...).

Différents milieux d'induction pour différencier les hMSC en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes ont été décrits. Pour l'adipogénèse, de l'insuline ainsi que de l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor), de la triiodothyronine et de la transferrine ont d'abord été utilisées<sup>327</sup>. Après plusieurs améliorations du protocole, de l'isobuthylméthylxantine, de l'hydrocortisone ou de la dexaméthasone, de l'indométhacine ou de la thiazolidinedione, du panthothénate, de la biotine et du sérum ont été ajoutés pour l'induction des hMSC en adipocytes<sup>328, 329, 330, 331</sup>. L'induction en ostéocytes est faite en utilisant de l'ascorbate, du  $\beta$ -glycérophosphate, de la dexaméthasone et/ou de la vitamine D3<sup>332, 333, 334</sup> alors que la chondrogénèse est effectuée avec du TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1), de la dexaméthasone, de l'ascorbate-2-phosphate, de la L-proline et de l'insuline<sup>335, 336, 337</sup>. Même si les processus de différenciation utilisant des produits chimiques sont bien connus, ils ont encore besoin d'être améliorés. En effet, la différenciation utilisant cette méthode prend du temps (de 15 jours à un mois)<sup>327</sup> et tous les tissus ne peuvent pas être produits de cette façon. De plus, les hMSC commencent à se différencier spontanément après 20 à 30 doublements de population et perdent leur capacité à donner différents tissus<sup>324, 338, 339</sup>. Par conséquent, les MSC ont une période d'utilisation courte et les chercheurs doivent renouveler régulièrement leurs stocks de cellules en recrutant de nouveaux donneurs. De plus, actuellement, le protocole actuel d'isolation des hMSC est coûteux en temps (un jour par donneur).

## *ii. La définition des hMSC*

La Société Internationale de Thérapie Cellulaire a proposé des critères pour la définition des MSC. Pour commencer, les hMSC ont été définies comme étant des cellules capables d'adhérer sur le plastique dans des conditions de culture classiques. De plus, ces cellules expriment un certain nombre de marqueurs de surface tels que CD73, CD90 et CD105 mais doivent être négatives pour les marqueurs de surface CD34, CD45, HLA-DR, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19. Pour finir, elles doivent être capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes<sup>340</sup> et en adipocytes<sup>100</sup> sous l'action de milieux chimiques de différenciation.

## *iii. Les différentes origines des MSC*

Actuellement, il est possible de collecter des hMSC à partir de différents tissus tels que la moelle osseuse<sup>341</sup>, le sang de cordon ombilical<sup>342</sup>, la membrane synoviale<sup>343</sup>, la pulpe dentaire<sup>344</sup>, la peau<sup>345</sup>, le muscle squelettique<sup>346</sup>, le sang périphérique<sup>347</sup> ou le tissu adipeux<sup>329</sup>. Les cellules provenant de ces différentes origines sont isolées à partir de différents types

de prélèvements qui sont plus ou moins accessibles aux chercheurs et qui permettent d'obtenir plus ou moins de cellules. Les MSC issues de ces différents tissus partagent les propriétés permettant de définir les MSC mais elles présentent des différences mineures au niveau des différents marqueurs de pluripotence et des potentiels de différenciation.

- Les bMSC et les hbMSC issues de la moelle osseuse

C'est en 1970 avec les travaux de Fridenstein *et al.* que les premières cellules souches adultes mésenchymateuses ont été isolées à partir de moelle osseuse (bone marrow en anglais, d'où bMSC) de cochons d'inde <sup>341</sup>. Auparavant, seul un autre type de cellules souches adultes provenant de la moelle étaient étudiées : les cellules souches hématopoïétiques. Les MSC ont été isolées grâce à leur capacité d'attachement au plastique. Elles ont d'abord été appelées cellules stromales avant d'être appelées cellules souches mésenchymateuses. Puis ces cellules ont été collectées à partir d'échantillons humains (hbMSC). Au cours des années 80, il a été montré que ces cellules (humaines ou d'animal) pouvaient se différencier en cellules du tissu mésenchymal, telles que les ostéocytes <sup>348, 349</sup>, chondrocytes <sup>350, 351</sup> et adipocytes <sup>352, 353</sup>. Depuis, il a été montré que ces cellules pouvaient aussi se différencier en cellules musculaires <sup>354</sup>, en cardiomyocytes <sup>355, 356</sup> en cellules nerveuses <sup>357, 358</sup>, en hépatocytes <sup>359, 360, 361</sup> et en cellules produisant de l'insuline <sup>361, 362</sup>.

L'inconvénient des hbMSC est que le prélèvement de moelle osseuses est un acte douloureux et que ces cellules sont aussi très précieuses en thérapeutique dans le domaine de la moelle de greffe. Par conséquent, il peut être difficile de s'approvisionner en hbMSC pour les chercheurs.

- Les aMSC et les haMSC issues du tissu adipeux

Les MSC issues du tissu adipeux ou aMSC et haMSC lorsqu'elles sont d'origine humaine sont plus faciles à collecter que les autres types précédents de hMSC (MSC humaines) car elles sont isolées à partir de déchets opératoires de lipo-aspirats de patients subissant des liposuccions. Cela permet d'avoir une grande quantité de donneurs potentiels et des échantillons volumineux (de quelques centaines de millilitres à quelques litres) qui permettent d'obtenir beaucoup de cellules (environ 10 millions de cellules pour 500 mL de lipo-aspirat).

Il existe plusieurs études comparatives mettant en parallèle les propriétés des haMSC avec celles des hbMSC.

L'étude de Lee *et al.* montre que les haMSC présentent les mêmes profils d'expression de protéines de surface que les hbMSC avec lesquelles elles partagent 99% de similitudes au niveau de l'expression génique<sup>324</sup>.

Par ailleurs, les travaux d'Adegani *et al.* (2013) comparent les propriétés de cellules souches de différentes origines de MSC et montrent que les hbMSC et les haMSC n'ont que de faibles différences dans l'expression de certains marqueurs de surface (Tableau 7).

**Tableau 7 : Comparaison de l'expression de marqueurs de surface des haMSC et des hbMSC.** D'après Adegani *et al.* (2013)<sup>363</sup>

Marqueur de surface	haMSC (% de la population)	hbMSC (% de la population)
CD34	4 ± 1	12 ± 1
CD45	5 ± 1	5 ± 1
CD90	97 ± 1	87 ± 1
CD105	93 ± 1	86 ± 1
CD106	58 ± 1	2 ± 1
CD133	15 ± 1	11 ± 1
CD166	70 ± 1	93 ± 1
CD271 (P75)	54 ± 1	75 ± 1
HLA-ABC	100 ± 1	99 ± 1
HLA-DR	8 ± 1	0 ± 1
4-Oct	45 ± 1	42 ± 1

Les marqueurs CD45, CD133, HLA-ABC et 4-oct sont retrouvés dans les mêmes proportions de cellules chez les hbMSC et chez les haMSC alors que les marqueurs CD34, CD166 et CD271 (P75) sont retrouvés en plus forte proportion chez les hbMSC que chez les haMSC. Ces deux types de MSC se différencient en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes en présence des milieux de différenciation chimique classiques. Par ailleurs, certains marqueurs sont retrouvés chez une plus faible proportion de la population chez les hbMSC que chez les haMSC comme par exemple CD90, CD105, CD106 ou HLA-DR. Ces travaux montrent aussi que les niveaux d'expression de marqueurs de pluripotence changent légèrement entre ces deux types de MSC. Par exemple, les hbMSC présentent des niveaux d'expression d'Oct4 et de c-Myc significativement supérieurs à ceux des haMSC. A l'inverse, les niveaux d'expression de Klf4 et de Lin28 sont très significativement plus importants chez les haMSC que chez les hbMSC<sup>363</sup>.

### c) Mécanismes des oscillations calciques spontanées

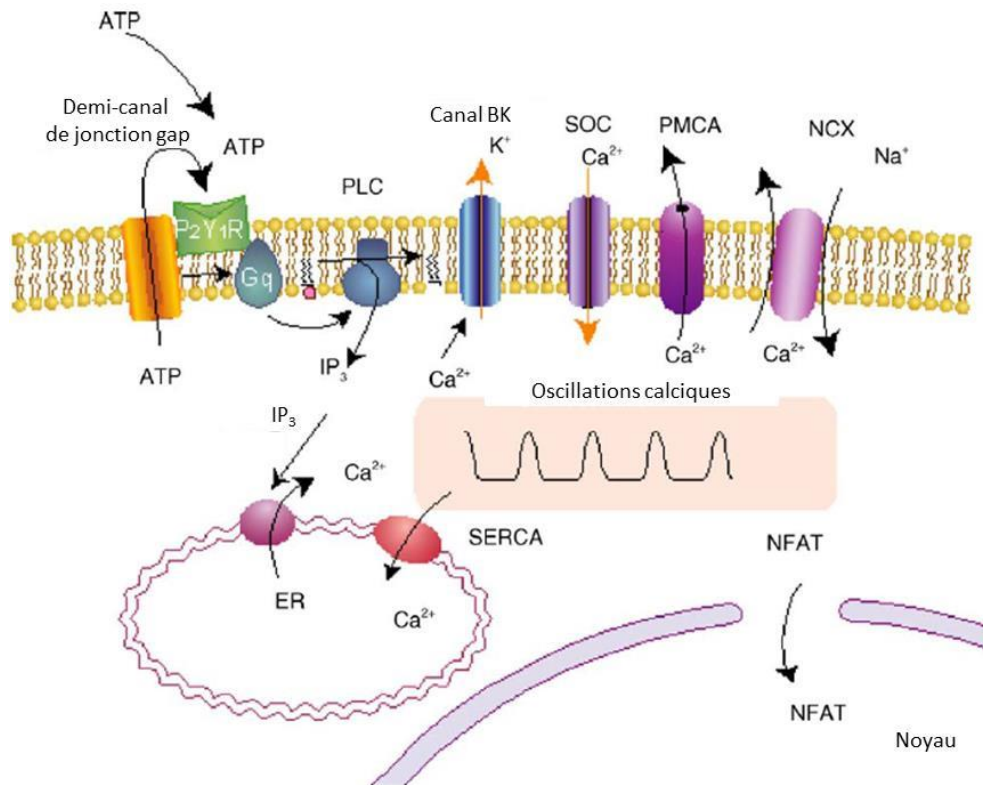
Il a été montré que les hMSC présentent des oscillations calciques spontanées impliquant certains canaux calciques de la membrane plasmique tels que principalement les SOCC (Store-Operated Calcium Channels) mais aussi de manière moins importante les VOC ainsi que des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE) tels que le canal calcique couplé à un récepteur à  $IP_3R$ <sup>89</sup>. En effet, ces oscillations sont empêchées par l'utilisation d'inhibiteurs tels que la tapsigargine, le 2-amino-ethoxydiphenyl borate (2-APB), la nifedipine, le chlorure de lanthanum(III) ( $LaCl_3$ ) ou le chlorure de gadolinium (III) ( $GdCl_3$ ) qui inhibent respectivement les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase), l' $IP_3R$ , les canaux calciques de type L (canaux voltage dépendants lents) et les canaux SOCC pour les deux derniers<sup>364</sup>. Lorsque le  $Ca^{2+}$  est retiré de la solution dans laquelle les hMSCs se trouvent, des oscillations sont encore visibles pendant quelques minutes et leur fréquence n'est pas modifiée alors que leur amplitude diminue. Cette observation semble donc suggérer que les oscillations calciques des hMSC ne sont pas régulées par le  $Ca^{2+}$  extracellulaire mais que ce dernier est impliqué dans l'amplification du signal. Ces oscillations semblent donc être contrôlées par le relargage de  $Ca^{2+}$  par le RE à travers les canaux  $IP_3R$  suivi par l'entrée de  $Ca^{2+}$  à travers les canaux de la membrane plasmique (principalement les SOCC)<sup>89</sup>.

Par ailleurs, le second type de mécanisme à l'origine du relargage du  $Ca^{2+}$  contenu dans le réticulum endoplasmique dépendant des RyR n'est pas impliqué dans les oscillations calciques spontanées des hMSC puisque l'utilisation de la caféine (qui est un inhibiteur des RyR) n'entraîne aucune altération de ces oscillations. De plus, des études moléculaires basées sur la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) ont montré que les gènes codant pour différents types de protéines  $IP_3$  ( $IP_3R$  I,  $IP_3R$  II et  $IP_3R$  III) sont exprimés dans les hMSC alors que le gène codant pour le type I des RyR n'est pas détecté par cette technique<sup>339</sup>.

Kawano *et al.* (2003) ont montré que l'exclusion du  $Ca^{2+}$  à travers les pompes calciques de la membrane plasmique telles que les PMCA (plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase) ainsi qu'à travers l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  étaient nécessaires au maintien des oscillations calciques des hMSC. Ils ont aussi démontré qu'il existe une relation entre les oscillations calciques et le transport d'ions  $K^+$  à travers les canaux potassiques à grande conductance activés par le  $Ca^{2+}$  (appelés canaux BK). Ainsi, les oscillations calciques des hMSC seraient à l'origine d'oscillations du potentiel transmembranaire<sup>365</sup>.

En 2006, Kawano *et al.* ont publié un article expliquant que les hMSC ont la particularité de sécréter de l'ATP (à travers les demi-canaux des jonctions gap) entraînant l'activation de récepteurs purinergiques de type  $P_2Y_1$  qui sont couplés à une protéine G permettant la synthèse d' $IP_3$ . (Figure 59).

De plus, cet article montre aussi que lorsque les hMSC sont dans un état indifférencié, elles présentent une translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells, qui peut être activé par le  $\text{Ca}^{2+}$ ) qui n'est pas retrouvée lorsque ces cellules sont différenciées en adipocytes. Les oscillations calciques des hMSC sont donc à l'origine de l'activation de NFAT.



**Figure 59 : Illustration schématique des mécanismes des oscillations calciques chez les hMSC. D'après Kawano *et al.* (2006)<sup>366</sup>.**

#### d) Rôles des oscillations calciques spontanées

Sun *et al.* ont rapporté que les hbMSC différenciées présentent des oscillations calciques dont la fréquence de répétition est plus faible que celle des cellules indifférenciées (une moyenne de 1,7 oscillations pour 30 min d'observation pour les cellules différenciées après 14 jours en milieu de différenciation ostéogénique contre 8,07 oscillations pour 30 min pour les cellules indifférenciées)<sup>90</sup>. Presque toutes les cellules indifférenciées montrent des oscillations alors que 20% des cellules différenciées ne montrent plus d'oscillations après 28 jours en présence de facteurs d'ostéoinduction. Sun *et al.* ont aussi montré que le fait de bloquer ces oscillations en utilisant un courant électrique continu de  $10 \text{ V.m}^{-1}$  facilite la différenciation des hbMSC en cellules osseuses. Après l'application d'une stimulation électrique continue de  $10 \text{ V.m}^{-1}$ , 30 min par jour pendant 10 jours en présence de milieu ostéogénique, le niveau d'activité de l'alkaline phosphatase (un marqueur d'ostéodifférenciation) est deux fois plus fort que dans le contrôle non exposé au champ

électrique. La minéralisation calcique est aussi beaucoup plus prononcée après l'exposition des cellules au champ électrique en présence de facteurs d'ostéoinduction. Les mécanismes reliant ces oscillations aux processus de différenciation n'ont pas encore été étudiés. Seule la répression de ces oscillations a été étudiée et il a été montré qu'elle peut promouvoir la différenciation en cellules osseuses.

De plus, il semblerait que les MSC ne présentent des oscillations calciques que pendant la transition G<sub>1</sub>/S des phases du cycle cellulaire<sup>367</sup>. Par conséquent, les cellules d'un même champ de visualisation ne présenteront pas toutes des oscillations pendant la durée de l'observation. Ces oscillations dépendantes de la voie inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) peuvent être liées au contrôle de la prolifération cellulaire. Les travaux de Resende *et al.* montrent que lorsque la voie IP<sub>3</sub> est artificiellement activée par des agonistes du récepteur à IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) chez les MSC il y a une augmentation de la prolifération et de l'expression de régulateurs du cycle cellulaire tels que les cyclines A et E<sup>367</sup>. À l'inverse, le blocage de ces oscillations par des antagonistes des IP<sub>3</sub>R entraîne une baisse de la prolifération et de l'expression de certains régulateurs du cycle cellulaire.

## **Objectifs de cette thèse**





Les techniques de perméabilisation des membranes par des agents chimiques et physiques sont des techniques qui ont été appliquées à différents domaines comme la médecine ou l'agroalimentaire. Même si ces applications sont utilisées en routine (électrochimiothérapie, transfert d'ADN, stérilisations de produits alimentaires, organismes génétiquement modifiés, ...) certains des mécanismes moléculaires résultants de l'interaction des champs électriques avec les membranes restent encore mal connus. Une partie de cette thèse a été consacrée à la comparaison entre des modèles de dynamique moléculaire et des expériences *in vitro* dans le cadre de l'étude du mécanisme d'action d'un agent chimique perméabilisant : le DMSO. La DM permet de faire des hypothèses sur les mécanismes mis en cause à l'échelle atomique ou moléculaire et constitue donc un outil très intéressant dans le cas des études sur les mécanismes de la perméabilisation membranaire.

Par ailleurs, une nouvelle branche dans la discipline de l'électroperméabilisation a émergé durant ces 10 dernières années : l'utilisation d'impulsions électriques ultra-courtes (impulsions nanoseconde). L'autre aspect de cette thèse s'est inscrit dans cette branche. Ces impulsions permettent de perméabiliser la membrane plasmique des cellules comme les impulsions longues, utilisées en médecine et en agroalimentaire, mais les impulsions nanosecondes ont aussi la particularité de pouvoir perméabiliser les membranes des organites intracellulaires. Cette particularité peut permettre de micromanipuler les cellules et plus particulièrement de micromanipuler les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires en permettant le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries (génération de pics calciques). Le calcium étant impliqué dans de nombreux phénomènes comme l'apoptose ou la différenciation cellulaire, la micromanipulation des concentrations calciques intracellulaires offre de nombreuses possibilités dans le domaine de la biologie.

De plus, un autre des objectifs de cette thèse était de participer au développement d'un nouveau dispositif d'exposition à ces impulsions ultra-courtes dans le cadre d'un contrat ANR avec d'autres membres de l'équipe d'accueil ainsi que d'autres laboratoires (ONERA, ENS-Cachan et CNRS-XLIM) dans le but d'étudier l'effet des impulsions nanoseconde sur les organites intracellulaires, et plus particulièrement sur le réticulum endoplasmique et sur la mitochondrie. Ce dispositif adaptable à la microscopie photonique et à épifluorescence a été conçu pour observer l'effet de l'application d'impulsions de quelques nanosecondes et de très forte intensité.

Ce dispositif a permis d'utiliser la possibilité de générer des pics calciques intracellulaires grâce à l'application d'impulsions nanosecondes sur un modèle de cellule possédant des

oscillations calciques spontanées, les cellules souches mésenchymateuses. En effet, les oscillations spontanées de ces cellules souches adultes capables de se différencier en différents types cellulaires sont impliquées dans le maintien de l'état indifférencié de ces cellules et dans leur multipotence. Cependant, ces cellules perdent spontanément leur multipotence au cours de leur culture *in vitro* (après une vingtaine de doublements de la population) et le maintien artificiel des oscillations calciques grâce aux impulsions nanoseconde pourrait permettre de modifier l'état de différenciation de ces cellules. Pour tester cette hypothèse, il fallait réussir à reproduire artificiellement ces oscillations spontanées en mettant en place une méthode de détection de ces pics calciques et en utilisant des paramètres électriques optimaux.

## **Résultats expérimentaux**



## **Article 1**

### **Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments In Silico and with Cells**

De Ménorval MA, Mir LM, Fernández ML, Reigada R.

PLoS One. 2012;7(7):e41733. Epub 2012 Jul 25.

Les études de DM antérieures à cet article étudiant les modes d'action du DMSO ont toujours été faites en n'utilisant que des bicouches composées d'un seul lipide. Cet article a la particularité d'utiliser des bicouches lipidiques composées de deux lipides : le DOPC et le cholestérol. Cette approche permet de travailler sur une membrane de composition plus proche de la composition de la membrane plasmique puisque dans certains types cellulaires, comme les CHO, le cholestérol représente jusqu'à 30% des lipides totaux de la membrane<sup>368</sup>. De plus le cholestérol joue un rôle très important dans les propriétés physiques de la membrane. Par exemple, selon la température, le cholestérol peut augmenter ou diminuer la fluidité de la membrane et comme le DMSO a comme effet sur la membrane d'augmenter sa fluidité, il est essentiel de travailler sur un modèle contenant du cholestérol pour que les prédictions puissent tendre vers la réalité.

L'autre particularité de cet article est de mettre en relation directe les simulations *in silico* avec des expériences *in vitro*. Les expériences ont été menées sur des cellules DC-3F (fibroblastes de poumons de hamster chinois) en présence de différentes concentrations de DMSO.

Cette étude présente la prédiction par des simulations *in silico* des effets du DMSO sur une bicouche lipidique contenant du cholestérol et la validation expérimentale de ces prédictions. Les prédictions de la DM annoncent trois régimes d'action du DMSO, sur une bicouche lipidique contenant 20% de cholestérol, en fonction de la concentration de DMSO, ainsi que la confrontation aux résultats *in vitro*. Le DMSO a comme propriété de pouvoir perméabiliser la membrane plasmique et la perméabilisation des cellules a été suivie, *in vitro*, en suivant différents marqueurs de perméabilisation (entrée d'eau, de calcium et de Yo-Pro, un marqueur de perméabilisation cellulaire).

Les trois régimes dépendant de la concentration en DMSO prédits en DM ont été confirmés *in vitro* dans le cadre des expériences sur les cellules DC-3F. A basse concentration de DMSO (<10 mol% d'après la DM et <15 vol% d'après les études *in vitro*), la membrane s'affine et se déforme, il y a apparition de pores hydrophobes sporadiques et très transitoires sans perméabilisation à l'échelle de la cellule. Pour des concentrations moyennes (entre 15 et 20 vol%), il y a apparition de pores hydrophiles stables et une perméabilisation des

cellules étudiées (entrée d'eau et de calcium). Pour des concentrations supérieures, la membrane est trop déformée et se disloque (DM) et on observe une mort cellulaire *in vitro*<sup>53</sup>. L'entrée du Yo-Pro n'est visible qu'à partir de 25 vol% de DMSO (régime III).

Même si les valeurs de seuil de concentration de DMSO des différents régimes observées diffèrent un peu entre la simulation *in silico* et les expériences *in vitro*, les prédictions de la DM ont totalement été confirmées par les expériences. La DM peut donc être très proche de la réalité biologique si les hypothèses de base de travail sont cohérentes, même si elle est appliquée à des systèmes simplifiés. Il est donc possible d'envisager d'utiliser la DM pour prédire certains résultats biologiques ou pour essayer d'expliquer les mécanismes moléculaires expliquant certains phénomènes biologiques encore mal connus.

Pour finir, les simulations de DM représentant des pores formés dans des bicouches lipidiques par le DMSO sont très proches et comparables aux pores retrouvées dans les simulations de DM où un champ électrique est appliqué. Les structures permettant le passage de molécules dans ces deux cas paraissent donc identiques. De plus, le DMSO et les impulsions électriques ont aussi la particularité de pouvoir induire des fusions cellulaires.

Il semble donc que ces méthodes reposent sur des mécanismes moléculaires très proches. Cependant, l'induction de la perméabilisation membranaire ou de la fusion cellulaire par le DMSO est plus difficile à mettre en place que lorsque des impulsions électriques sont utilisées. D'une part, il faut appliquer l'agent perméabilisant plus longtemps dans le cas du DMSO. D'autre part, l'agent perméabilisant chimique ne peut pas être retiré du système rapidement et totalement (il reste toujours des traces, surtout lorsque l'agent perméabilisant chimique s'insère dans la membrane comme pour le DMSO) alors qu'après que les impulsions électriques aient été appliquées, l'agent perméabilisant physique n'est plus présent.

# Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments *In Silico* and with Cells

Marie-Amélie de Ménorval<sup>1,2,3</sup>, Lluís M. Mir<sup>1,2,3</sup>, M. Laura Fernández<sup>4,5</sup>, Ramon Reigada<sup>6\*</sup>

**1** Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Orsay, France, **2** CNRS, Orsay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Orsay, France, **3** Institut Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France, **4** Laboratorio de Sistemas Complejos, Departamento de Computación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, **5** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina, **6** Department de Química Física and Institut de Química Teòrica i Computacional, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

## Abstract

Dimethyl sulfoxide (DMSO) has been known to enhance cell membrane permeability of drugs or DNA. Molecular dynamics (MD) simulations with single-component lipid bilayers predicted the existence of three regimes of action of DMSO: membrane loosening, pore formation and bilayer collapse. We show here that these modes of action are also reproduced in the presence of cholesterol in the bilayer, and we provide a description at the atomic detail of the DMSO-mediated process of pore formation in cholesterol-containing lipid membranes. We also successfully explore the applicability of DMSO to promote plasma membrane permeability to water, calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and Yo-Pro-1 iodide (Yo-Pro-1) in living cell membranes. The experimental results on cells in culture can be easily explained according to the three expected regimes: in the presence of low doses of DMSO, the membrane of the cells exhibits undulations but no permeability increase can be detected, while at intermediate DMSO concentrations cells are permeabilized to water and calcium but not to larger molecules as Yo-Pro-1. These two behaviors can be associated to the MD-predicted consequences of the effects of the DMSO at low and intermediate DMSO concentrations. At larger DMSO concentrations, permeabilization is larger, as even Yo-Pro-1 can enter the cells as predicted by the DMSO-induced membrane-destructuring effects described in the MD simulations.

**Citation:** de Ménorval M-A, Mir LM, Fernández ML, Reigada R (2012) Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments *In Silico* and with Cells. PLoS ONE 7(7): e41733. doi:10.1371/journal.pone.0041733

**Editor:** Giorgio Colombo, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy

**Received:** April 13, 2012; **Accepted:** June 25, 2012; **Published:** July 25, 2012

**Copyright:** © 2012 de Ménorval et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Financial support is provided by Secretaría de Estado de Investigación i Desarrollo through project BFU2010-21847-C02-02 and by Departament d'Universitats, Recerca i Sistemes de la Informació through project 2009-SGR-1055. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Gustave Roussy and Université Paris-Sud XI and by the French National Agency for Research through the Intell ANR-10-BLAN-916 and Memove ANR-11-BS01-006 grants. The work was also supported by grants from Universidad de Buenos Aires (UBACyT X132/08), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 112-200801-01080/09), and Ministerio de Ciencia y Tecnología (SLO-AR 08/02/09). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: reigada@ub.edu

## Introduction

Dimethyl sulfoxide (DMSO,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ) is a small amphiphilic molecule that is traditionally used as a cryoprotectant [1], solvent for peptides in NMR studies [2], cell fusogen [3], and chemical penetration enhancer to deliver active molecules through the skin and into the cells [4]. Experimental studies devoted to the investigation of the specific changes of lipid in membranes in the presence of DMSO have revealed that this compound replaces water in the inner region of the lipid headgroup [5] and causes an increase of area per lipid and a decrease of membrane thickness [6]. These effects have been confirmed by means of Molecular dynamics (MD) simulations in a series of recent articles. Sum and de Pablo demonstrated that DMSO is preferentially placed below the headgroup of the membrane lipids [7]. A similar behavior is reported in simulations of ceramide bilayers [8], where DMSO is shown to promote phase transition from gel to liquid crystalline phase. All these observations suggest an increase of the membrane permeability in the presence of DMSO that has been already

confirmed by simulations. Anwar et al. showed a DMSO-mediated enhancement of the permeability through the formation of water pores, both in atomistic [9,10] and coarse-grained [11] MD simulations.

Although the MD studies mentioned above have already addressed this issue, there is an important actor that has been missing in all these studies: cholesterol (Chol). Chol is the most common lipid component in animal cell membranes and its content ranges depend on the cell type. For example, in CHO cells (Chinese Hamster Ovary cells, same species than the cells used in our experiments), Chol can represent up to a 30 mol% of the total membrane lipid molecules [12]. Chol is fundamental for determining many structural properties of the cell membrane: by means of its condensing effect, inclusion of Chol results in more densely packed and ordered membranes, thus dramatically reducing their spontaneous permeation to small molecules. Due to these strong effects on membrane cohesion, it is not obvious that the mechanisms of action of DMSO captured so far by MD



simulations in single-component bilayers are also instrumental in Chol-containing bilayers. The understanding of the molecular details of the action of DMSO in living mammalian cell membranes requires, therefore, the study of Chol-containing lipid bilayers.

In this context, the ability of DMSO to facilitate transport across the cell membrane has been rather unexplored so far. Actually, despite the huge potentiality of the membrane permeabilizing effect of the DMSO, only sporadic and specialized experimental works have been devoted to it without investigations about the mechanism involved [13]. Our first motivation is then to propose that DMSO could be exploited in processes that involve transport across the cell membrane in order to improve or even develop new drug delivery approaches or new transfection techniques in laboratory and clinical treatments. Here, we contribute to this issue with complementary approaches that cover a broad perspective ranging from molecular simulations at the atomic level to the experimental implementation in living cells.

In this paper we report the main observations from MD simulations of Chol-containing dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) bilayers under the influence of DMSO. The main qualitative behaviors reported previously [7–11] for single-lipid bilayers are captured here for Chol-containing membranes and in particular we characterize the three regimes of action of DMSO as a function of its concentration in the solvent phase [9–11]. Interestingly, pore formation in DOPC/Chol bilayers is reported at intermediate DMSO fractions, and a close inspection of simulation trajectories allows the description of a molecular-detailed mechanism that discloses the role of each of the system components in the pore formation process. Particularly, DMSO provides a new poration mechanism that facilitates water to penetrate the hydrophobic region of the membrane, thus increasing the occurrence of pore formation.

Experiments with living cells were conducted to reproduce the main observations of numerical simulations. It is the first time that experiments trying to analyze the DMSO permeability are systematically conducted. We decided to study the effects of different DMSO concentrations on the cell membrane permeability of three markers of different sizes. Different experiments using a fibroblast cell line are reported here, displaying permeabilization to water,  $\text{Ca}^{2+}$  ions and Yo-Pro-1 for a range of DMSO concentrations. These experiments not only demonstrate the permeabilization due to DMSO in living cells, but they also reveal, as a function of the DMSO concentration, the different behaviors that were predicted from the *in silico* (numerical) observations.

## Results and Discussion

### Molecular Dynamics Simulations

**Three modes of DMSO action.** MD Simulations are run for DOPC membrane systems mixed with 20 mol% of Chol and different molar fractions of DMSO in the solvent mixture. As reported in Ref. [9], three distinct modes of action are observed depending on DMSO concentration. At low DMSO fractions ( $\leq 10$  mol%, regime I), membranes experience significant structural changes (see below). In this regime, only sporadic and very transient hydrophobic pores can be arranged in form of single-molecule water columns that cross the membrane and rapidly disappear (Figure 1). We have observed that the occurrence of transient pore formation increases with DMSO content.

At intermediate DMSO concentrations (regime II), membranes display the previous behavior during a few nanoseconds until stable pores are formed. The sequence of pore formation is well

known [9]: an initial water fluctuation crosses the whole membrane and a hydrophobic pore is formed, the lipid molecules around it rotate and cover the water filament with their hydrophilic headgroups forming a hydrophilic pore that rapidly widens and becomes stabilized (see Figure 2).

At large DMSO amounts ( $\geq 40$  mol%, regime III), the lipid bilayer first displays the effects reported in regime I, until extreme undulations and multiple pore formation destroy the membrane configuration (not shown).

**Low DMSO fractions already affect the main structural membrane properties.** At low DMSO fractions ( $\leq 10$  mol%), the simulated membranes display structural modifications but still preserve their bilayer conformation (no pore is formed yet). A first inspection of the simulated membranes shows that they become more undulated after addition of DMSO. Although this flexibility gain has not been particularly quantified, it can be related to a series of molecular/microscopic membrane properties that are summarized in this section.

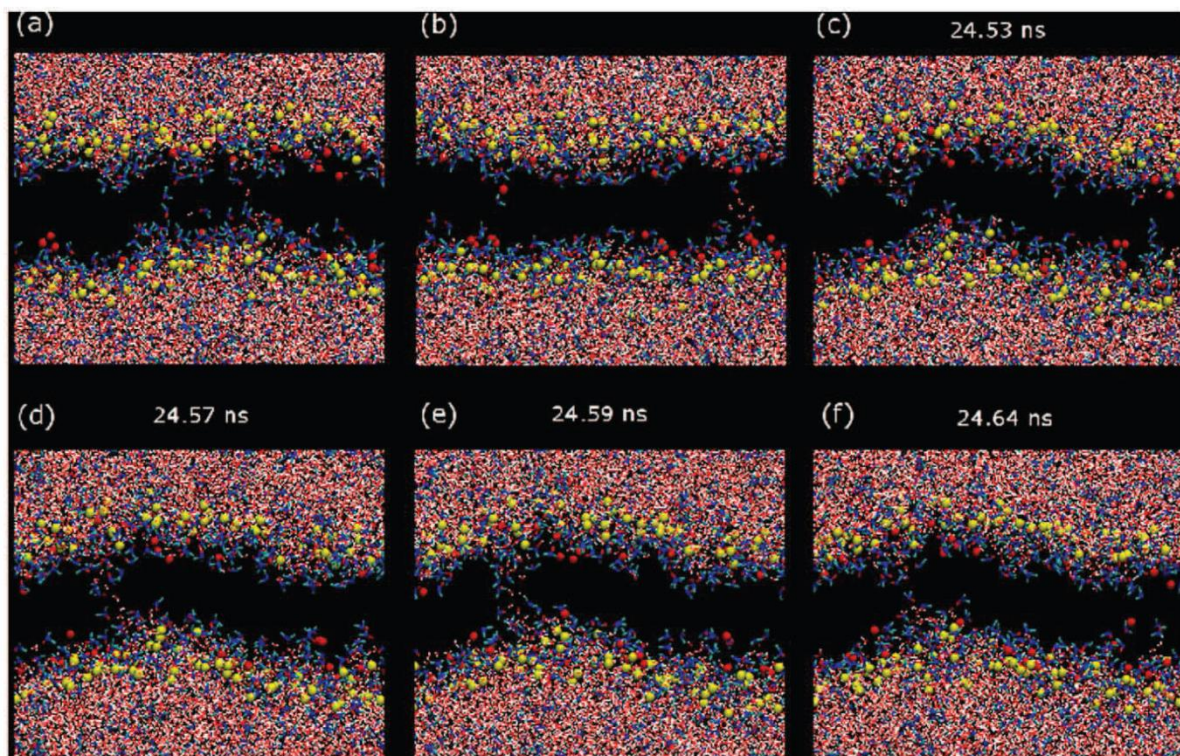
As anticipated above, even if initially placed in the bulk aqueous phase, DMSO molecules partially penetrate the membrane. The analysis of the mass density profiles plotted in Figure 3a reveals that DMSO is preferentially located in the inner membrane/water interface region, close to the phosphate groups as it corresponds to its amphiphilic nature. Figure 3a also depicts that the incorporation of DMSO to the membrane breaks its transversal ordering: in the absence of DMSO lipid profiles show the typical features obtained from diffraction experiments (two pronounced lipid density peaks in the phosphate group positions and a minimum in the middle of the bilayer), whereas upon addition of DMSO, lipid density profiles are smoothed. It has to be also noticed that the addition of DMSO increases water penetration into the membrane (Figure 3a), so it seems that DMSO replaces water in the interfacial regions but does not totally exclude it.

The equilibrium values for the main structural properties of the simulated membranes are provided in Table 1. As anticipated, addition of DMSO increases the total simulated membrane area (see area in Table 1) and reduces the bilayer thickness, here estimated as the average distance between phosphorous atoms in opposite leaflets (see P-P distance in Table 1). For example, addition of 5 mol% of DMSO in the solvent phase causes an increase of about 30% in membrane area and a reduction of 13% in thickness.

The internal ordering of lipid membranes is typically quantified by means of the deuterium order parameter,  $-S_{\text{CD}}$  [14]. Larger values for  $-S_{\text{CD}}$  imply higher chain ordering. The average order parameter  $\langle -S_{\text{CD}} \rangle$ , taken as the average for all CD segments, quantifies globally the disordering effect. Addition of 5 mol% of DMSO decreases chain ordering by 40% in 20 mol% Chol bilayers (see Table 1). A closer inspection of  $S_{\text{CD}}$  profiles along lipid chains (not shown) reveals how DMSO has a strong disordering effect in all carbon segments, not only in those close to the inner membrane/water interface where DMSO is accumulated. Therefore, DMSO increases the membrane area and leaves more free space inside the whole hydrophobic region of the membrane, so that lipid tails become less packed and freer to adopt more disordered configurations.

The orientation of the lipid components is also a common outcome of the internal membrane order. Ordered membranes normally display lipids rather oriented in the bilayer normal direction. The orientation of an acyl chain can be quantified by its tilt angle with respect to the bilayer normal. The average values for the lipid tail tilt angle are presented in Table 1 and corroborate the above-mentioned observations: addition of DMSO inclines DOPC molecules. Chol tilt is also increased upon addition of DMSO





**Figure 1. Fluctuations and transient water pores.** Snapshots in the (x,z) view for the dynamics of a DOPC/20%Chol bilayer with 10 mol% DMSO. The first two snapshots illustrate the existence of water fluctuations that promote the presence of single (a) or groups (b) of a few water molecules in the hydrophobic region of the membrane. (c–f) Sequence of the formation and collapse of a transient water pore. Water molecules are plotted with red and white sticks whereas red, blue and green sticks are used for DMSO molecules. DOPC and Chol molecules are not plotted except for their phosphate (yellow beads) and hydroxyl (red beads) groups, respectively.  
doi:10.1371/journal.pone.0041733.g001

(Table 1), reflecting that its ability to order the membrane has been reduced [15].

Another important issue on membrane structure is its lateral organization. To quantify the lateral order, spatial pair density correlation functions  $C_{PC/PC}(r)$  have been computed and plotted in Figure 4. These functions measure the density variation of the center of mass of DOPC molecules with respect to its average density as a function of the in-plane distance  $r$  from the center of mass of a DOPC molecule. Spatial ordering is observed as correlation peaks that correspond to the different coordination shells. As it is observed in Figure 4 spatial correlation is clearly lost upon addition of DMSO.

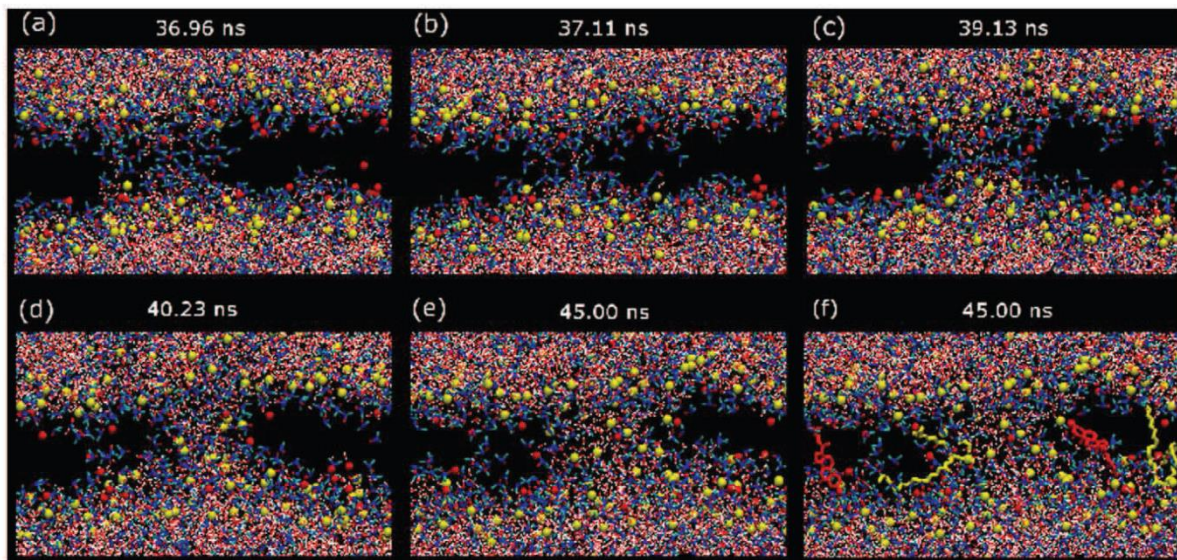
Although stable pores are not still formed at the DMSO fractions reported in this section, membrane permeability displays an increase upon addition of DMSO. Membrane permeability to a particular compound can be characterized by the variation of free energy as a function of the position of a molecule of this compound along the bilayer normal, the so called potential of mean force (PMF). This function,  $\Delta G(z)$ , can be computed from the mass density profiles,  $\rho(z)$ , obtained in MD simulations using  $\Delta G(z) = -k_B T \ln(\rho(z)/\rho_0)$  where  $\rho_0$  is the average density of the analyzed compound in the bulk phase. A large barrier of the PMF implies that the membrane is rather impermeable to the analyzed compound. The PMF profiles are plotted in Figure 3b for different amounts of DMSO and show that water and DMSO molecules can be eventually transported across the simulated

DOPC/20%Chol bilayers. In the hydrophobic region of these membranes, water and DMSO display an energy maximum that is reduced after addition of DMSO (see Figure 3b). The activation energy for water is always larger than for DMSO, but becomes reduced after addition of DMSO; namely, DMSO permeabilizes lipid membranes to water. The passage of water molecules across the membrane is performed in two different ways. One way is that single water molecules cross the membrane, whereas the other mechanism implies a collective process to form a water-column pore that traverses the hydrophobic region of the membrane (transient hydrophobic pore). These transient hydrophobic pores are reminiscent of the recently described nanopores or electropores in MD simulation of membranes exposed to large voltage differences [16,17]. Addition of DMSO molecules promotes the latter mechanism (see Figure 1). No lipid headgroup collective reorientation is observed during the formation process of this kind of transient pores. As explained above, further addition of DMSO may result in stable (hydrophilic) pore formation.

So far, all the results reported in this section evidence that the role of DMSO is to counteract the condensing effect of Chol. Whereas Chol increases membrane packing, ordering and cohesion, DMSO has the opposite effect.

**Molecular mechanism of DMSO-mediated pore formation.** The molecular characteristics of DMSO provide this compound with the particular abilities that have been reported so far in this paper, and that are fundamental to depict the

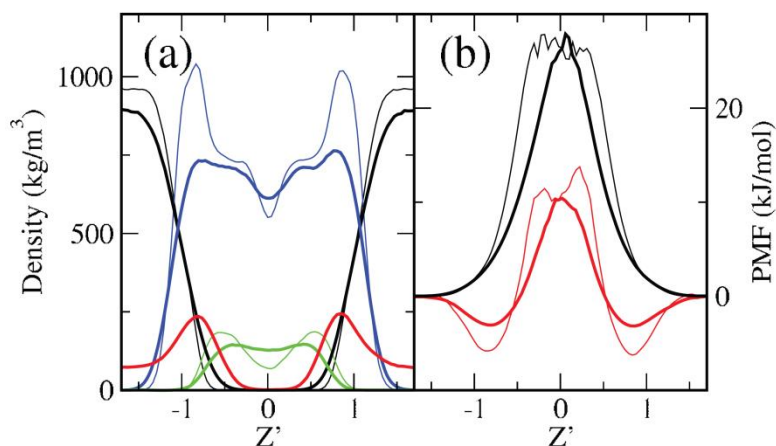




**Figure 2. Sequence of stable pore formation.** (a–e) Snapshots in the (x,z) view for the dynamics of formation of a stable hydrophilic water pore in a DOPC/20%Chol bilayer with 15 mol% DMSO. Water molecules are plotted with red and white sticks whereas red, blue and green sticks are used for DMSO molecules. DOPC and Chol molecules are not plotted except for their phosphate (yellow beads) and hydroxyl (red beads) groups, respectively. (f) The same as in panel (e) but some representative DOPC (yellow sticks) and Chol (red sticks) molecules forming (the ones parallel to the bilayer plane) and non forming (the ones perpendicular to the bilayer plane) the hydrophilic pore are plotted.  
doi:10.1371/journal.pone.0041733.g002

molecular mechanism of DMSO-mediated pore formation. Its small size and its amphiphilic nature facilitate its interaction with the different groups coexisting in the inner membrane/water interface. In this location, it can be conjectured that the hydrophilic part of DMSO interacts with water and polar head groups, whereas the two hydrophobic methyl groups interact with the hydrophobic inner membrane region. This hypothesis is confirmed by computing the average profile orientation of the vector connecting the O and S atoms of DMSO (dipole vector pointing from the negative to the positive parts of the molecule). In

Figure 5, the average angle of this vector with the bilayer normal (pointing outwards at each leaflet) is plotted for a DOPC/20%Chol membrane system with 5 mol% DMSO, although the general features are preserved for other solvent compositions. A random orientation of the dipole vector would result in an average angle of  $90^\circ$ . However, the average dipole angle is larger than  $90^\circ$  in both leaflets, and this means, as speculated above, that DMSO is preferentially aligned in such a way it approaches its O atom to the lipid polar groups and places their methyl groups in the more hydrophobic region of the interface.



**Figure 3. Mass density and membrane permeability profiles.** (a) Mass density and (b) potential of mean force (PMF) profiles in a DOPC/20%Chol bilayer. Thick lines correspond to 5 mol% DMSO systems, whereas thin curves stand for 0 and 1 mol% DMSO in the (a) and (b) panels, respectively. The profiles correspond to water (black), DOPC (blue), Chol (green) and DMSO (red) and are represented in a scaled distance respect to the bilayer center where the maxima of phosphate groups are fixed at  $Z' = \pm 1$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0041733.g003

**Table 1.** Averaged properties characterizing the simulated DOPC/20%Chol bilayer systems.

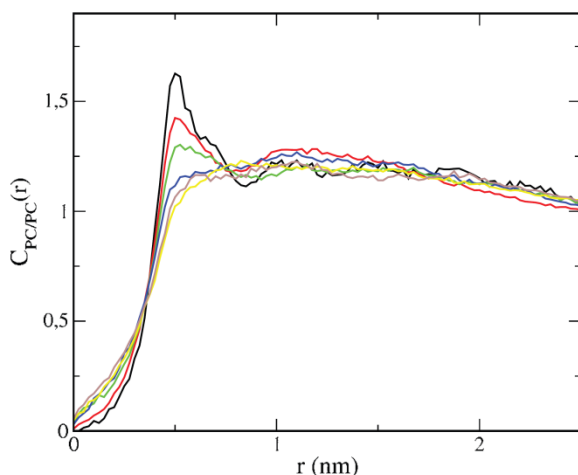
%mol DMSO	Area (nm <sup>2</sup> )	P-P dist (nm)	<-S <sub>CD</sub> >	Lipid tail angle (°)	Chol angle (°)
0	44.5	4.17	0.1528	28.26	30.88
1	47.5	3.93	0.1503	30.62	29.27
2.5	52.5	3.70	0.1205	34.76	31.89
5	58.1	3.60	0.0994	38.17	31.05
7.5	63.9	3.25	0.0809	41.09	34.84
10	68.4	3.14	0.0775	41.65	39.20

doi:10.1371/journal.pone.0041733.t001

Water molecules also display a preferential orientation close to the membrane interface. In Figure 5 the orientation profile for the water dipole (again defined pointing from the negative to the positive charged part of the molecule) respect to the bilayer normal is also presented. In both leaflets, water molecules located close to the membrane/water interface are aligned with their H atoms pointing to the membrane.

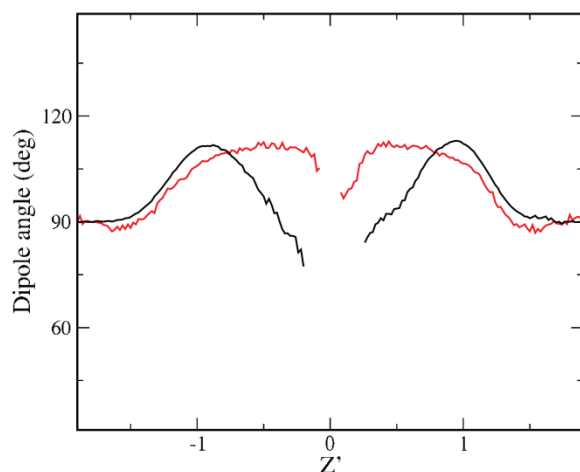
The preferential orientation of DMSO molecules in the membrane interface is crucial to understand the permeability gain reported so far. First, the increase of water penetration observed in mass density and permeability profiles (Figure 3) is mediated by the presence of DMSO in the interface membrane region: DMSO occupies the inner interface region, but due to its dual character it acts as a surfactant and stabilizes the presence of water molecules. Namely, DMSO partially dehydrates the lipid polar region but increases the water presence in more inner parts of the membrane interface well below the phosphate groups. Second, a detailed inspection of the transient water pores formed in regime I (see Figure 1) reveals that DMSO molecules wrap the initial water fluctuations and the ensuing transient water columns, thus promoting the permeability gain observed in Figure 3.

Finally, the formation of stable water pores in regime II is also directly mediated by DMSO. The molecular mechanism visualized in Figure 2 shares some common features with pore formation in electroporation conditions [18,19]. First, the disordering of the water molecules at the membrane interface may eventually generate a water defect that initiates pore formation. Then, such water defect can develop into a water column penetrating into the inner region of the bilayer (hydrophobic pore). Further on, the lipid head groups (including the hydroxyl groups of Chol molecules) reorient in order to cover the initial water column and form a hydrophilic pore (see the sequence in Figure 2). As a difference with electroporation, here DMSO plays a crucial role in the initiation, growth and stabilization of pores. In Figure 6 this role is clearly illustrated for the examples in Figures 1 and 2 by plotting cross-section snapshots of the simulated systems at different pore formation steps. In a first stage, DMSO stabilizes the initial water fluctuations with a sort of envelope that act as a surfactant protection (see Figure 6a). In a second step, the water column is wrapped in a similar manner by DMSO molecules so its hydrophobic character is tempered and becomes stable for longer time (see Figure 6b). Finally, lipid head groups rotate to form the



**Figure 4. Lateral ordering of lipid tails.** Spatial pair density correlation functions of the PC acyl chains,  $C_{PC/PC}(r)$ , for the simulated DOPC/20%Chol bilayers under the influence of different amounts of DMSO. The color code indicates the DMSO content: 0 mol% (black), 1 mol% (red), 2.5 mol% (green), 5 mol% (blue), 7.5 mol% (yellow) and 10 mol% (maroon).

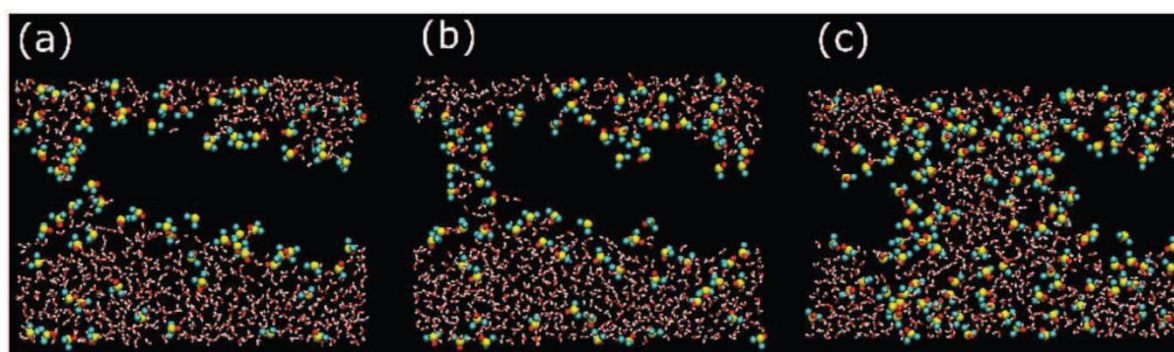
doi:10.1371/journal.pone.0041733.g004



**Figure 5. Preferential orientation of DMSO and water molecules.** Membrane profiles of the dipole orientation angle respect to the bilayer normal (pointing outwards at each leaflet) of DMSO (red) and water (black) molecules. In both cases the dipole vector points to the positively charged part of the analyzed molecule. Results from a DOPC/20 mol%Chol bilayer with 5 mol% DMSO in the solvent mixture. The profiles are represented in a scaled distance respect to the bilayer center where the maxima of phosphate groups are fixed at  $Z' = \pm 1$ .

doi:10.1371/journal.pone.0041733.g005





**Figure 6. DMSO stabilizes water fluctuations and pores.** Snapshots in the (x,z) view for system slices with thickness 0.4 nm in the 'y' coordinate. Water molecules are plotted with red and white sticks, whereas beads are used for DMSO molecules. For clarity, lipids are not plotted. (a) Detail of the initial water fluctuation in the Figure 1c. (b) Detail of the water column in Figure 1e. (c) Detail of the stable pore in Figure 1e.

doi:10.1371/journal.pone.0041733.g006

hydrophilic pore, but even in this final situation, DMSO molecules are still located surrounding the water pores (see Figure 6c).

The observations reported in this section indicate that DMSO-induced permeability effects are not only caused by the modification of membrane properties that, in turn, facilitate the water passage across the membrane. Instead, we have demonstrated that permeability is mediated directly by DMSO. Namely, DMSO provides an exclusive mechanism of membrane permeability whose molecular details have been unveiled in this paper. This mechanism is rather independent of membrane composition: it has been presented here for DOPC/20%Chol bilayers, but it is also reproduced in DOPC/40%Chol and Chol-free systems (not shown).

### Experiments with Living Cells

To confirm the results obtained by the MD simulations, experiments with living cells were performed. Three markers of permeabilization were studied: water,  $\text{Ca}^{2+}$  and Yo-Pro-1. The crossing of water through the cell plasma membrane was first assessed as it is a common phenomenon studied in MD simulations [20–22]. The observations made on water (MW = 18 g/mol) were then corroborated by monitoring the  $\text{Ca}^{2+}$  (MW = 40.1 g/mol) entry in the cell. Finally, the extent of the permeabilization was estimated by assessing the entrance of Yo-Pro-1 (Yo-Pro-1 iodide MW = 629 g/mol), a non-cell permeant molecule also used as a permeabilization marker [23,24]. This is a larger marker than the calcium ion.

**Permeabilization to water at different concentrations of DMSO.** Cell permeabilization to water was monitored by microscopy. If the cells are permeabilized to water, they will shrink or swell, depending on the interior and exterior osmotic pressures, which will affect the global shape of the cells and their volume. The aspect of the cells after one hour of incubation in the presence of different concentrations of DMSO is shown on Figure 7. After one hour in the presence of 10 vol% of DMSO (2.74 mol%), small undulations of the plasma membranes and the absence of swelling indicated that the membrane is affected but there is no massive entry of water molecules. The MD description of regime I shows that water can cross the membrane in limited amount due to a very restricted passage but it is not enough to impact the cell volume. In the presence of 20 vol% of DMSO (5.97 mol%), the plasma membranes were affected enough to be permeabilized and allow the entry of water as the cells exhibited a

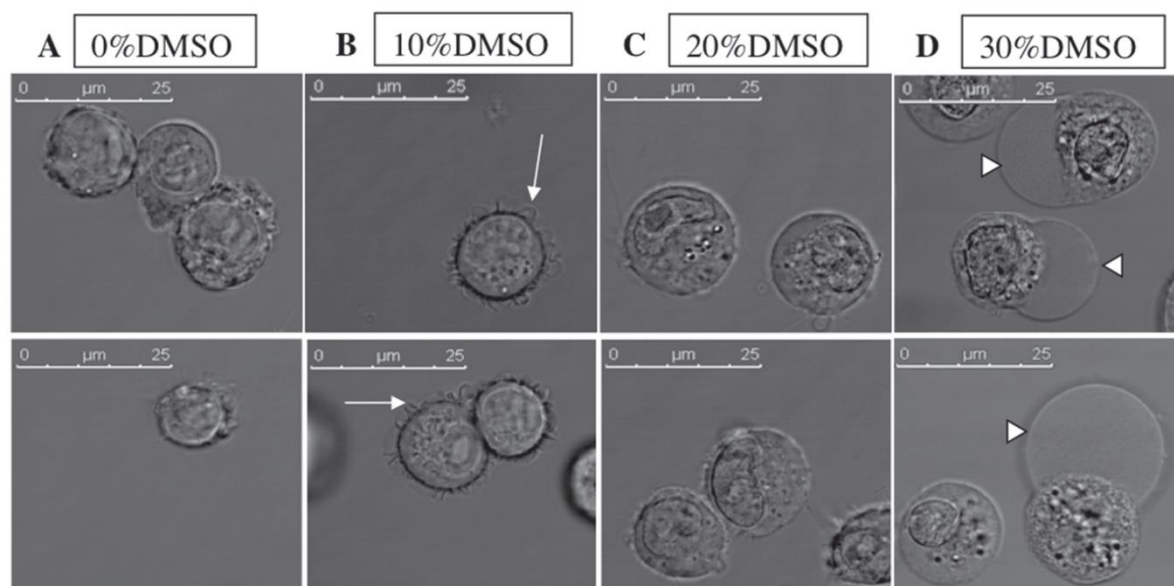
round and swollen shape with smooth membranes. The stable pores of regime II allow for an unrestricted crossing of the membrane and a net influx of water that is observed in the experiments with cells.

In the presence of 30 vol% of DMSO (9.79 mol%), numerous blebs were observed on the plasma membranes suggesting a dissociation between the membrane and the cytoskeleton and thus indicating a stronger effect of the DMSO on the membrane structure than for lower concentrations of DMSO. Plasma membrane blebs are dynamic cell protrusions that have been implicated in several biological phenomena (apoptosis, cytokinesis, cell movement, electroporation, ...) [25,26]. Considering the generation of these blebs, the associated global cell volume increase also reflects DMSO-induced membrane permeabilization.

The three regimes found in the MD simulation are thus characterized in these experiments. At low concentrations of DMSO (e.g. 10 vol%), the undulations of the plasma membrane are in agreement with the decrease of membrane thickness and the concomitant increase of membrane area described in the regime I of the MD simulations. At an intermediate concentration of DMSO (e.g. 20 vol%), the permeabilization to water (revealed by the round shape of the cells and their volume increase) is in agreement with the apparition of stable pores as explained in the regime II. At higher concentrations of DMSO (more than 30 vol%) the observed blebs reveal cell membranes damages in accordance with the regime III of the MD simulations.

A quantitative approach of the water permeabilization has been done by following the relative cell volume changes throughout the incubation in the presence of DMSO (Figure 8). Actually, the diameter of cells in suspension was measured 3 and 33 minutes after the addition of the DMSO. It was not possible to measure the cell diameter at earlier times after the addition of the DMSO because the cells, which are round and not attached to their support, had to stabilize and stop moving before start taking the picture on which diameters were later measured. Pictures were taken every minute during 30 minutes and were used to quantitatively investigate the relative volume changes of the cells. At 10 vol% DMSO, this quantitative approach revealed that cells diameters shrink by 9.4% ( $p < 0.001$ ). The shrinking of the cells is the consequence of an hyperosmotic shock since the addition of DMSO causes an increase in the osmolarity of the solutions [27]. At 20 vol% DMSO, cells diameters enlarged by





**Figure 7. Morphology of DC-3F cells in bright field microscopy.** For A, B, C and D the upper and the lower panels are two different fields on the same slide. (A) DC-3F cells without DMSO. (B) Cells in the presence of 10% of DMSO with membrane undulations (arrows). (C) Round and swollen cells in the presence of 20% of DMSO. (D) Cells in the presence of 30% of DMSO presenting blebs (arrows heads). Cells were observed with a 63x objective. DMSO was diluted in complete MEM. Pictures were taken after 1 h of incubation in the different solutions. doi:10.1371/journal.pone.0041733.g007

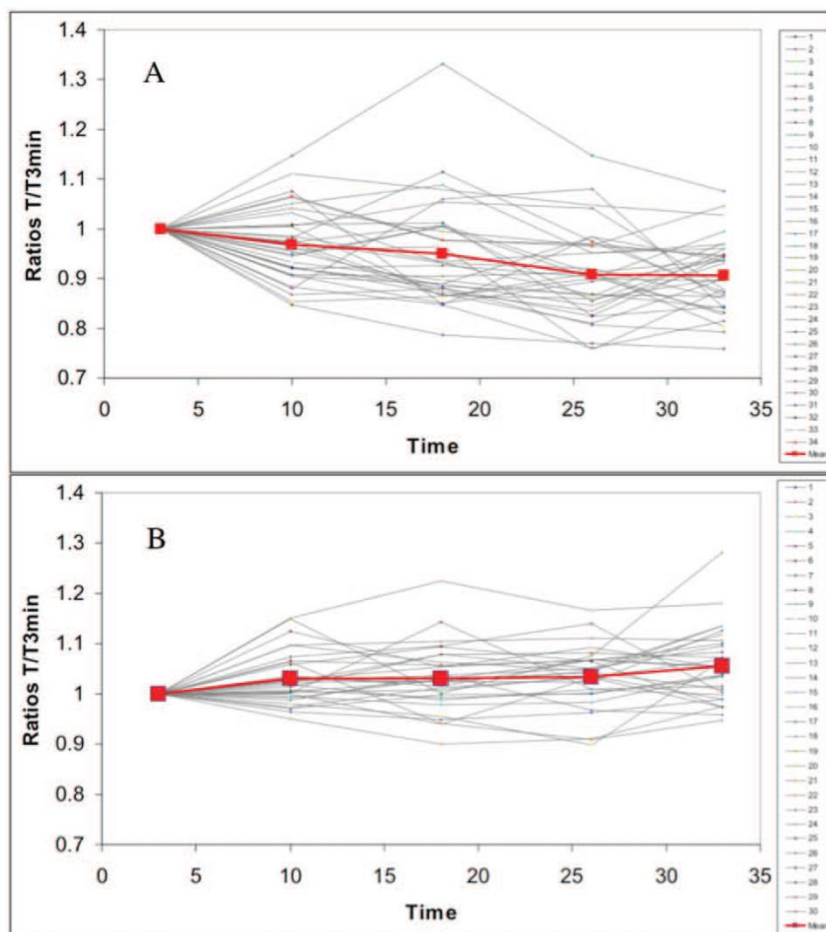
5.6% ( $p < 0.001$ ). This cell swelling suggests that there is a membrane permeabilization sufficient to allow the entry of the DMSO (MW = 78 g/mol) as proposed by the MD simulations. Under these conditions, exchanges of small ions should also occur resulting in an unbalanced osmotic pressure due to the so-called colloid osmotic mechanism [28,29]. Shortly, small soluble particles can freely cross the porated membrane to balance the electrochemical, osmotic and concentration gradients. Conjointly, larger soluble particles that cannot cross the membrane are trapped inside the cell and unbalance the osmotic pressures leading to a water entry. Actually, penetration of  $\text{Ca}^{2+}$  ions will be shown in the next section. Experiments could not be reasonably conducted at 30 mol% because the cell morphology was too much altered (presence of blebs that prevents accurate measurements of the cell diameters).

**Permeabilization to calcium at different concentrations of DMSO.** We used the Fluo-4-AM calcium marker to monitor the cytosolic calcium concentration and evidence the cell plasma membrane permeabilization to  $\text{Ca}^{2+}$ . The cells were loaded with the calcium marker Fluo-4-AM which possesses acetoxymethyl groups (AM) allowing the molecule to enter the cell and preventing calcium binding outside of the cell. Once the marker is inside the cytoplasm, the AM groups are cleaved by endogenous esterases resulting in both the trapping of the fluorophore and its activation.

The kinetics of the  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilization induced by the DMSO is reported on Figure 9, the increase in Fluo-4 fluorescence is revealing the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (this calcium is coming from the external medium MEM which contains 1.8 mM of  $\text{Ca}^{2+}$ ). The values are ratios between the fluorescence intensity of the sample and the fluorescence of the control measured at the same time to account for the photobleaching of the marker throughout the experiment. The kinetics was dose-dependent and the maximum value of Fluo-4 fluorescence depended on the DMSO concentration. For DMSO

concentrations of 15 vol% and above,  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation seems increasingly faster with increasing DMSO concentrations. Actually, taking the values at 15 minutes and 30 minutes, the extrapolation to the base line (ratio 1) occurs at time zero for most of the DMSO concentrations (10 vol%, 15 vol%, 25 vol% and 40 vol%). This means that calcium starts entering the cells immediately after the beginning of the exposure to the DMSO. It can also be speculated that the larger the DMSO concentration, the larger the membrane perturbation and the faster the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake as shown in the Figure 9. After 60 minutes of exposure to the DMSO, there is a slow down in the Fluo-4 fluorescence increase and even a plateau of the fluorescence value in the cases of 15 vol% and 20 vol% of DMSO. This plateau could be due to the fact that a stationary state in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is generated between the calcium entering the cell through the DMSO-affected membrane and the normal storage of the calcium in the endoplasmic reticulum reservoirs. Indeed, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is a cellular parameter strongly regulated in cells. Therefore, these results suggest that the DMSO allows the increase of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by making the membrane permeable to the  $\text{Ca}^{2+}$  ions and this difference in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induces the activation of the  $\text{Ca}^{2+}$  intracellular concentration regulation mechanisms.

Because the flow of  $\text{Ca}^{2+}$  at 20 vol% of DMSO should be larger than the flow at 15 vol% of DMSO, resulting in a higher concentration at the stationary state it can be deduced that Fluo-4 (MW = 736 g/mol) does not leak the cells through the DMSO-permeabilized membrane at least during the first 180 minutes after the addition of the DMSO. However, it was not possible to exclude an interaction of the DMSO with the Fluo-4 that could be responsible for the difference in the fluorescence plateau values as a function of the DMSO concentration. The influence of DMSO on the Fluo-4 fluorescence what thus determined. The DMSO increases this fluorescence (Data S1) but the most important enhancement of the



**Figure 8. Evolution of diameters of DC-3F cells.** Values taken during 30 min (from 3 to 33 min) in the presence of 10 vol% (A) and 20 vol% (B) of DMSO. The cells are incubated with complete MEM and DMSO. doi:10.1371/journal.pone.0041733.g008

signal due to this phenomenon at 40 vol% of DMSO is less than a 1.5-fold increase in comparison to the 0 vol% of DMSO. In Data S1 we show that for 40 vol% of DMSO, after 180 min, there is a 4.7 fold increase in the fluorescence which cannot be explained just by the action of the DMSO on the Fluo-4.

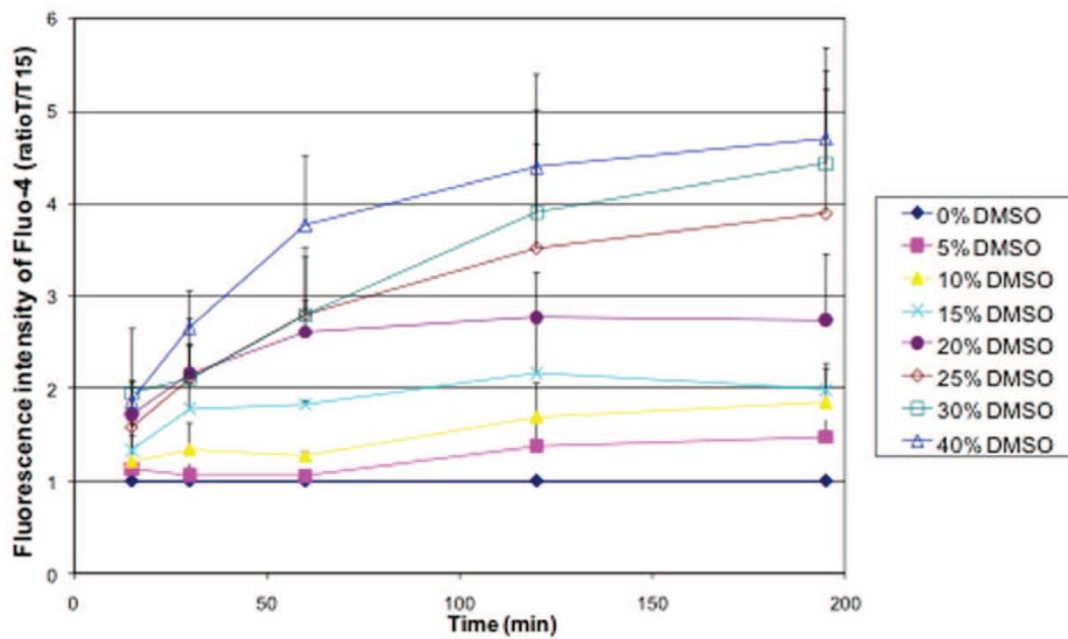
In conclusion, the three regimes were also detectable in the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake experiments. The regime I, corresponding to less than 10 vol% of DMSO, where there is no stable pore formed, results in almost no increase in fluorescence, at least at short incubation times. The regime II (15 vol% and 20 vol% of DMSO) displays stable pores and results in membrane permeabilization to  $\text{Ca}^{2+}$ . The lack of plateau in the presence of 25 vol%, 30 vol% and 40 vol% of DMSO seems to show a perturbation too strong to be counter-balanced by the cell. This is consistent with the regime III and the description of a destruction of the membrane configuration.

**Permeabilization to Yo-Pro-1 at different concentrations of DMSO.** Yo-Pro-1 is unable to cross the intact membranes. If it may enter the cell, as a DNA-intercalant dye it binds to DNA and become much more fluorescent than the free Yo-Pro-1 [23,24]. The permeabilization of cells by the DMSO is clearly detectable using the Yo-Pro-1 (Figure 10). First of all, there is no measurable permeabilization up to 15 vol% of DMSO after

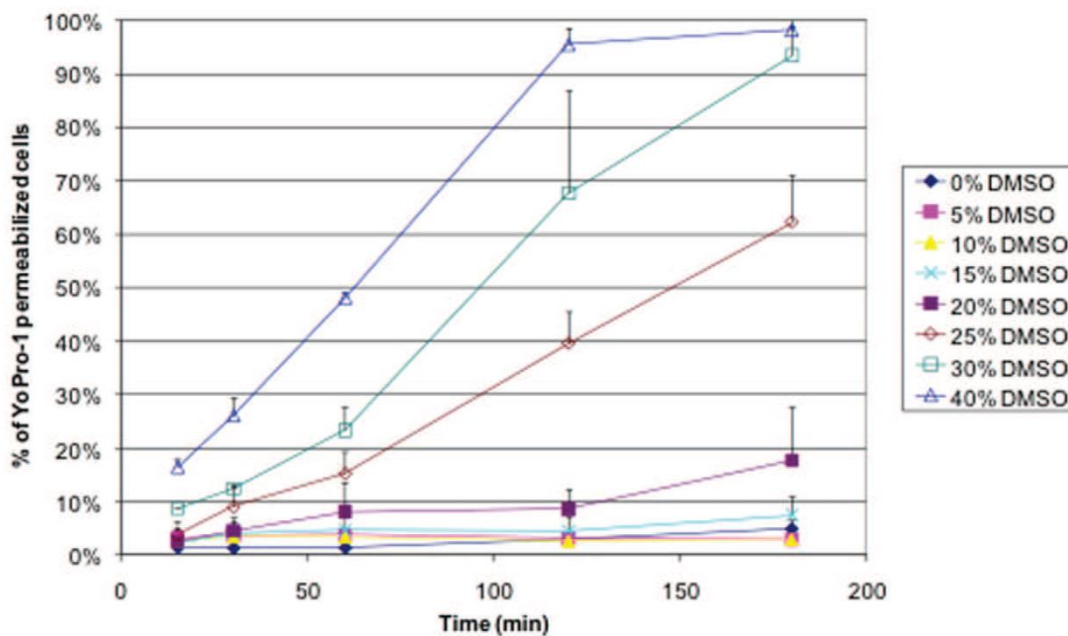
3 hours of incubation in the presence of DMSO. At 15 vol% and 20 vol% of DMSO, no or very small amounts of Yo-Pro-1 enter the cells. Finally, above 20 vol% of DMSO, the higher the concentration of the DMSO, the faster and the more extended the cell permeabilization. Again, Yo-Pro-1 uptake seems to start immediately after the addition of DMSO.

Because Yo-Pro-1 strongly binds to DNA when it enters the cells it cannot go out anymore and the Yo-Pro-1 fluorescence cannot further decrease as no mechanism can exclude the Yo-Pro-1 after its binding to the DNA. This is why all the conditions in which DMSO permeabilizes the cell membrane are tending to the same percentage of Yo-Pro-1 permeabilized cells (100%) whereas, in the Figure 9, the maximum value of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of each sample depends on the DMSO concentration.

The same regimes as the ones described in the  $\text{Ca}^{2+}$  experiments and the MD simulations are found here. There is no detectable permeabilization up to 10 vol% of DMSO (regime I). At 15 vol% and 20 vol% of DMSO a reduced permeabilization is measured, in agreement with the fact that Yo-Pro-1 is a molecule larger than the  $\text{Ca}^{2+}$  (regime II). In the presence of 25 vol%, 30 vol% and 40 vol% of DMSO, (regime III), the



**Figure 9. Kinetics of the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by DC-3F cells in the presence of different concentrations of DMSO (From 0 vol% to 40 vol%).** DMSO was diluted in complete MEM. Data collected by flow cytometry. Error bars correspond to standard deviations calculated from three independent experiments.  
doi:10.1371/journal.pone.0041733.g009



**Figure 10. Kinetics of the Yo-Pro-1 uptake by DC-3F cells in the presence of different concentrations of DMSO (From 0 vol% to 40 vol%).** DMSO was diluted in complete MEM. Data collected by flow cytometry. Error bars correspond to standard deviations calculated from three independent experiments.  
doi:10.1371/journal.pone.0041733.g010



permeabilization is fast and starts after the contact with the DMSO.

## Conclusions

In this paper we have presented a combination of numerical and experimental results regarding the effect of DMSO on cell permeability, a phenomenon with important consequences in many procedures in biotechnology and medicine that require the transfer of chemicals inside the cells through their plasmatic membrane.

It is important to notice, that our MD simulations have been performed on phospholipids bilayers containing Chol. In animal cells, there is always Chol in the membrane lipid mixture, and since this compound is fundamental for determining many structural properties of the cell membrane, and in particular its permeability to small molecules, Chol-containing membrane is a better model to study permeabilization effects than single-lipid bilayer. Summarizing, our simulations reveal that DMSO counteracts the condensing effect of Chol in the membrane properties: whereas Chol promotes membrane packing, ordering and cohesion, DMSO has the opposite effect. Additionally, the three modes of action of DMSO (membrane loosening, pore formation and bilayer collapse) reported in previous MD studies for single-lipid bilayers [7–11] are captured here for Chol-containing systems. This finding constitutes a clear progress in order to validate the applicability of the numerical observations regarding the effect of DMSO to biological cell membranes.

The most relevant effect of DMSO is its ability to form hydrophilic (stable) pores in a lipid bilayer. Detailed inspection of the pore formation process has revealed that DMSO provides an exclusive mechanism of membrane permeability whose molecular details have been unveiled in this paper. Due to its small size and amphiphilic nature, DMSO molecules are located in the inner membrane/water interface region, stabilizing the initial water fluctuations and subsequent hydrophobic water columns, protecting them from the hydrophobic membrane environment. The general characteristics of this mechanism based on a specific DMSO surfactant-like action are rather independent of the nature of the lipid bilayer. It has been reported here for our DOPC/20%Chol bilayers, but it has been also captured in membranes containing up to a 40 mol% (not shown).

Experiments with living cells have qualitatively confirmed the results from numerical simulations and have demonstrated the feasibility of DMSO-induced membrane permeabilization in living cells. At low DMSO fractions (<15 vol%), membranes display undulations that may correspond to the regime I described in the simulations. No water,  $\text{Ca}^{2+}$  or Yo-Pro-1 entrance is significantly accounted in this regime. At intermediate DMSO fractions (15 vol% and 20 vol%, in the experiments reported here) water and  $\text{Ca}^{2+}$  enter the cell as detected by the cells swelling and by the Fluo-4 fluorescence increase respectively. This situation may correspond to the regime II characterized in the MD simulations with the generation of stable pores in the membrane. At higher DMSO fractions (>20 vol%) cells are presenting numerous extended blebs suggesting a loss in the membrane integrity leading to membrane destruction as shown in the regime III. In this case, cell plasma membrane permeabilization is easily detected even with the Yo-Pro-1 molecule. It is noticeable that the concentrations of DMSO used in cryopreservation, between 5 vol% [30] to 20 vol% of DMSO [31], are corresponding to regimes I and II which preserve cell integrity. It can be easily understood that larger DMSO fractions cannot be used because of their toxicity.

To conclude, we have presented a comparison between atomistic simulations and experiments with real cells that validates

for the first time the DMSO regimes of action in Chol-containing membranes and the qualitative verification of these regimes in real cells. Notice that simulated membranes are extremely simplified membrane systems, far for the complexity of biological plasma cell membranes (inserted proteins, lateral organization in rafts, attachment to cytoskeleton, etc.), and as a consequence any attempt to make quantitative predictions is not achievable. However, real qualitative behaviors and trends can be captured with numerical simulations as shown in this paper.

## Materials and Methods

### Molecular Dynamics Simulations and Protocols

The MD simulations were performed using the GROMACS v.3.3.1 software package [32]. For DOPC molecules we used the standard united-atom force-field parameters developed by Berger et al. [33]. The partial charges were taken from Ref. [34] and the force field parameters for the double-bond region are based on the adaptation performed by Bachar et al. [35,36]. The Simple Point Charge (SPC) model was employed for water. The force field parameters of Holtje et al. [37] were used for Chol. The DMSO force field description developed by Bordat et al. [38] was used here as in a number of other recent papers reporting MD simulations with DMSO [9,10]. The SETTLE algorithm was used to preserve the bond lengths in water molecules, whereas the lipid and DMSO bond lengths were constrained with the LINCS algorithm. A single 1.0 nm cut-off distance was used for the Lennard-Jones interactions. The long-range electrostatic interactions were handled using the particle-mesh Ewald method with a real space cut-off of 1.0 nm,  $\beta$ -spline interpolation (of order 6), and direct sum tolerance of  $10^{-5}$ . Periodic boundary conditions were used in all three directions, and the time step was set to 2 fs.

The simulations were carried out in the NpT ensemble at  $p = 1$  atm and  $T = 310$  K. In these conditions, all simulated membranes displayed a fluid state. The temperature and pressure were controlled by using the weak coupling method [39] with the relaxation times set to 0.6 and 1.0 ps, respectively. The pressure coupling was applied separately in the bilayer plane ( $xy$ ) and the perpendicular direction ( $z$ ).

### Description of the Simulated Systems

We carried out atomic-scale MD simulations for DOPC membrane systems mixed with 20 mol% of Chol. All bilayers were composed of 128 DOPC molecules together with 32 Chol molecules, homogeneously distributed in the two leaflets. All DMSO-free systems were sufficiently hydrated with 6186 water molecules, and their initial configurations were taken from previously equilibrated DOPC bilayers from Ref. [40].

Bilayers with different amounts of DMSO were also simulated. In all cases, the number of solvent molecules was fixed to 6186, but the molar fraction of DMSO in the water/DMSO mixture was varied. Each bilayer system was run for 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40 and 60 mol% of DMSO were run for DOPC/20%Chol membranes. DMSO molecules were included in the equilibrated pure lipid membranes in three different manners: randomly in the whole system or as a DMSO box in the water/membrane interface or in the aqueous bulk phase. In the three cases, DMSO molecules were partially absorbed by the bilayer and the equilibrium is taken when DMSO density profiles were independent of the initial insertion place and remained constant after a few nanoseconds.

Equilibration of the bilayers was determined by monitoring the membrane area and the DMSO density profile. The simulated membranes are equilibrated after 20 ns, and all temporal averages

for the computation of membrane properties were performed in a period of 25 ns after equilibration was reached. The simulation protocol applied here has been successfully applied in previous MD simulations [36,40], and the obtained values for structural membrane properties such as the area per molecule, the membrane thickness, and the scattering form factors have been well in line with experimental data for pure DOPC bilayers and their counterparts with 20 mol% of Chol [41].

### Cell Line and Culture Conditions

DC-3F cells (Chinese hamster lung fibroblast cells) [42] were grown in MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The cells culture chemicals were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and the DMSO from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Cells were propagated at 37°C in a humidified 5% carbon dioxide atmosphere.

### Cell Imaging and Size Measurements

For the observation of the DC-3F cells morphology in the presence of different concentrations of DMSO, a confocal microscope Leica TCS SPE with an objective ACS APO 63x, 1.30 NA oil and the LAS AF software version 2.4 (Leica, Germany) was used.

For the cell size measurements, DC-3F cell images were taken with a Zeiss AxioCam Hrc and Axio Vision 4.6 software (Carl Zeiss, Germany) on a Zeiss Axiovert S100 epifluorescence inverted microscope. The diameters ( $D_T$ ) of the same cells were measured after 3 (D3 min), 10, 18, 26 and 33 minutes of incubation in DMSO. The ratio  $D_T/D3$  min is reported.

### Flow Cytometry and Calcium Permeabilization

Adherent DC-3F cells were incubated 30 minutes in the presence of 5 µM of Fluo-4 AM ( $\lambda_{ex}$  = 496 nm,  $\lambda_{em}$  = 515 nm, Invitrogen) at 37°C and in a humidified 5% carbon dioxide atmosphere. Then the cells were detached from the culture support using Tryple Express solution (Invitrogen),

centrifugated and suspended in MEM containing DMSO from 0% to 40% vol/vol (DMSO to water molar ratio ranging from 0% to 14.5% mol/mol). Cells were incubated under constant agitation at 37°C and in a humidified 5% carbon dioxide atmosphere.  $10^4$  cells were analyzed in a C6 Flow Cytometer Accuri (USA) at different times.

### Flow Cytometry and Yo-Pro-1 Permeabilization

Adherent DC-3F cells were detached from the culture support using Tryple Express solution, centrifugated and suspended in MEM in the presence of 5 µM of Yo-Pro-1 ( $\lambda_{ex}$  = 491 nm,  $\lambda_{em}$  = 509 nm, Invitrogen), used as an indicator of membrane permeabilization, and DMSO from 0% to 40% v/v (DMSO to water molar ratio ranging from 0% to 14.5% mol/mol). Cells were incubated under constant agitation at 37°C and in a humidified 5% carbon dioxide atmosphere.  $10^4$  cells were analyzed in a C6 Flow Cytometer Accuri at different times.

All the experiments have been done 3 times and the results are expressed as means  $\pm$ SD.

### Supporting Information

**Data S1 Influence of the DMSO on the Fluo-4 fluorescence.** (DOC)

### Acknowledgments

Computational resources were provided by the Barcelona Supercomputing Center and by the Centro de C  mputos de Alto Rendimiento (CeCAR) – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA. MLF gratefully acknowledges Professor G. Marshall.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LMM RR. Performed the experiments: MAM MLF RR. Analyzed the data: MAM LMM MLF RR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAM LMM MLF RR. Wrote the paper: MAM LMM MLF RR.

### References

- Rall WF, Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of Mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313: 573–575.
- Amodio P, Motta A, Picone D, Saviano G, Tancredi T, et al. (1991) Viscosity as a conformational sieve. NOE of linear peptides in cryoprotective mixtures. *J. Magn. Reson.* 95, 201–207.
- Ahkon QF, Fisher D, Tampion W, Lucy JA (1975) Mechanisms of cell fusion. *Nature* 253: 194–195.
- Kligman AM (1965) Topical pharmacology and toxicology of dimethylsulfoxide. *J Am Med Assoc.* 193: 796–804.
- Tristram-Nagle S, Moore T, Petrache I, Tagle JF (1998) DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study. *Biochim. Biophys. Acta* 1369: 19–33.
- Yu ZW, Quinn PJ (2000) The effect of dimethyl sulphoxide on the structure and phase behavior of palmitoleoylphosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* 1509: 440–450.
- Sum AK, de Pablo JJ (2003) Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 85: 3636–3645.
- Notman R, den Otter WK, Noro MG, Briels WJ, Anwar J (2007) The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics. *Biophys. J.* 93: 2056–2068.
- Gurtovenko AA, Anwar J (2007) Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J. Phys. Chem. B* 111: 10453–10460.
- Gurtovenko AA, Anwar J (2007) Ion transport through chemically induced pores in protein-free phospholipid membranes. *J. Phys. Chem. B* 111: 13379–13382.
- Notman R, Noro MG, O'Malley B, Anwar J (2006) Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 13982–13983.
- Callaghan R, van Gorkom LCM, Epan RM (1992) A comparison of membrane properties and composition between cell lines selected and transfected for multi drug resistance. *Br. J. Cancer.* 66: 781–786.
- Melkonyan H, Sorg C, Klempt M (1996) Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucl. Acids Res.* 24: 4356–4357.
- Davis JH (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by  $^2\text{H}$ -NMR. *Biochim. Biophys. Acta.* 737: 117–171.
- Aittoniemi J, R  g T, Niemel   P, Pasenkiewicz-Gierula M, Karttunen M, et al. (2006) Tilt: major factor in sterols' ordering capability in membranes. *J. Phys. Chem. B.* 110: 25562–25564.
- Vernier PT, Ziegler MJ (2007) Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B.* 111: 12993–12996.
- Ziegler MJ, Vernier PT (2008) Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B.* 112: 13588–13596.
- Tarek M (2005) Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 88: 4045–4053.
- Levine ZA, Vernier PT (2010) Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *J. Membrane Biol.* 236: 27–36.
- Fern  ndez ML, Marshall G, Sagu  s F, Reigada R (2010) Structural and kinetic molecular dynamics study of electroporation in cholesterol-containing bilayers. *J. Phys. Chem. B.* 114: 6855–6865.
- Reigada R, Fern  ndez ML (2011) Structure and electroporation of lipid bilayers: a molecular study. XXXth URSI GASS congress book ([http://ursigass2011.org/abstracts/AbstractBook\\_v2.htm](http://ursigass2011.org/abstracts/AbstractBook_v2.htm)).
- Vernier PT, Levine ZA, Wu YH, Joubert V, Ziegler MJ, et al. (2009) Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. *PLoS Onc.* 4: e7966.



23. Vernier PT, Sun Y, Gundersen MA (2006) Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell. Biol.* 19:7–37.
24. Bowman AM, Nesin OM, Pakhomova ON, Pakhomov AG (2010) Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of Tl(+) uptake. *J. Membr. Biol.* 236: 14–26.
25. Fackler OT, Grosse R (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell. Biol.* 181: 879–84.
26. Tsong TY (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* 60: 297–306.
27. Runckle DN, Swanson JR (1980) Effect of dimethyl sulfoxide on serum osmolality. *Clin. Chem.* 26: 1745–1747.
28. Okada Y (2004) Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.* 41: 233–258.
29. Kinoshita K Jr, Tsong TY (1977) Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature.* 268: 438–441.
30. Day JG, Stacey GN (2007) *Cryopreservation and Freez-Drying Protocols*, second edition. Ed.; Humana Press, Totowa, New Jersey. 77 p.
31. Valdez CA, Mazni OA, Takahashi Y, Fujikawa S, Kanagawa H (1992) Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. *J. Reprod. Fert.* 96: 793–802.
32. Lindahl E, Hess B, van der Spoel D (2001) GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* 7: 306–317.
33. Berger O, Edholm O, Jahnig F (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72: 2002–2013.
34. Tieleman DP, Berendsen HJC (1996) Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. *J. Chem. Phys.* 105: 4871–4880.
35. Bachar M, Brunelle P, Tieleman DP, Rauk A (2004) Molecular dynamics simulation of a polyunsaturated lipid bilayer susceptible to lipid peroxidation. *J. Phys. Chem. B.* 108: 7170–7179.
36. Martinez-Scara H, Róg T, Karttunen M, Reigada R, Vattulainen I (2008) Influence of cis double-bond parameterization on lipid membrane properties: how seemingly insignificant details in force-field change even qualitative trends. *J. Chem. Phys.* 129: 105103.
37. Holtje M, Forster T, Brandt B, Engels T, von Rybinski W, et al. (2001) Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1511: 156–167.
38. Bordat P, Sacristan J, Reith D, Girard S, Glättli A, et al. (2003) An improved dimethyl sulfoxide force field for molecular dynamics simulations. *Chem. Phys. Lett.* 374: 201–205.
39. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81: 3684–3690.
40. Martinez-Scara H, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M, et al. (2008) Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of double-bond position. *Biophys. J.* 95: 3295–3305.
41. Hung WC, Lee MT, Chen FY, Huang HW (2007) The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys. J.* 92: 3960–3967.
42. Biedler JL, Riehm H (1970) Cellular resistance to actinomycinD in Chinese Hamster cells in vitro: Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30, 1174–1184.

## **Article 2**

### **A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells**

Dalmay C, De Ménorval MA, Français O, Mir LM et Le Pioufle B.

Lab Chip. 2012 ; 12 : 4709

Cet article rapporte le résultat d'une collaboration entre différentes institutions (ONERA, CNRS et ENS) ayant pour but de réaliser un nouveau dispositif d'exposition de cellules aux impulsions nanoseconde de très haute amplitude en permettant une observation simultanée en microscopie photonique et à épifluorescence des cellules exposées à ces impulsions.

Ce dispositif a comme particularité d'avoir une impédance de  $50\ \Omega$  contrairement à la majorité des dispositifs d'exposition couramment utilisés. Cette impédance permet au dispositif d'être parfaitement adapté au circuit électrique ce qui a pour conséquences d'éviter les réflexions du signal électrique dans le dispositif et permet d'utiliser la totalité des capacités des générateurs connectés au circuit. De plus, pour éviter toute toxicité due au relargage de particules issues de l'usure des électrodes, celles-ci ont été réalisées en or puisque les ions or n'interviennent dans aucun mécanisme biologique et ne présentent pas de forte toxicité comme, par exemple, les ions cuivre. Ces électrodes parallèles ont été disposées très proches les unes des autres ( $150\ \mu\text{m}$ ) pour permettre de générer un champ électrique très important. Les impulsions pouvant être générées dans ce dispositif peuvent atteindre  $35\ \text{MV.m}^{-1}$ , ce qui est plus important que les amplitudes de champ utilisées dans les études existantes précédentes. Un autre intérêt de ce dispositif est qu'il permet de travailler sur des cellules en suspension (qui sont déposées entre les électrodes) ainsi que sur des cellules attachées (qui sont cultivées sur des lamelles de verre et ensuite disposées au-dessus du canal formé par les électrodes).

Cet article présente les caractéristiques et le processus de fabrication des puces de quartz sur lesquelles les électrodes ont été « dessinées » par la méthode de photolithographie ainsi que des simulations évaluant l'homogénéité du champ électrique au sein de l'espace inter-électrode et une confirmation *in vitro* de l'efficacité de ce dispositif.

Les simulations montrent que l'homogénéité du champ électrique est très bonne sur la largeur du canal (entre les deux électrodes face à face) mais aussi sur sa hauteur (du fond du dispositif jusqu'en haut des électrodes) lorsque les canaux formés par les électrodes sont fermés par une lamelle de verre. Le dispositif a été évalué en utilisant des cellules DC-3F et en suivant la perméabilisation de la membrane plasmique due aux impulsions « nanoseconde » de 10 ns utilisées au laboratoire. Pour suivre la perméabilisation des

cellules, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane plasmique, a été mesurée en utilisant un marqueur fluorescent du  $\text{Ca}^{2+}$ , le Fluo-4 AM, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  extérieur. L'intensité de fluorescence de ce marqueur est étroitement liée à la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique. L'application d'une seule impulsion de 10 ns et de  $280 \text{ kV.m}^{-1}$  sur des cellules DC-3F adhérentes et étalées a permis de générer un pic de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique provenant de l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extérieur (le milieu de culture contenant  $1,8 \text{ M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ainsi que de la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  des organites internes tels que le réticulum endoplasmique (riche en  $\text{Ca}^{2+}$ ).

De plus, l'analyse de l'origine du pic calcique fait l'objet du troisième article de cette thèse. Dans ce troisième article, le dispositif a permis de générer des pics calciques avec un autre type cellulaire, les cellules souches mésenchymateuses.

Cite this: *Lab Chip*, 2012, 12, 4709–4715

www.rsc.org/loc

PAPER

## A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells

C. Dalmay,<sup>†a</sup> M. A. De Menorval,<sup>†bcd</sup> O. Français,<sup>a</sup> L. M. Mir<sup>bcd</sup> and B. Le Pioufle<sup>\*a</sup>

Received 27th July 2012, Accepted 5th September 2012

DOI: 10.1039/c2lc40857k

The biological mechanisms induced by the application of nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs: high electrical field amplitude during very short duration) on cells remain partly misunderstood. In this context, there is an increasing need for tools that allow the delivering of such pulses with the possibility to monitor their effects in real-time. Thanks to miniaturization and technology capabilities, microtechnologies offer great potential to address this issue. We report here the design and fabrication of a microfluidic device optimized for the delivery of ultra short (10 ns) and intense (up to 280 kV cm<sup>-1</sup>) electrical pulses on adherent cells, and the real time monitoring of their intracellular effects. Ultra short electric field pulses (nsPEFs or nanopulses) affect both the cell membrane and the intracellular organelles of the cells. In particular, intracellular release of calcium from the endoplasmic reticulum was detected in real time using the device, after exposure of adherent cells to these nsPEFs. The high intensity and spatial homogeneity of the electric field could be achieved in the device thanks to the miniaturization and the use of thick (25 μm) electroplated electrodes, disposed on a quartz substrate whose transparency allowed real time monitoring of the nsPEFs effects. The proposed biochip is compatible with cell culture glass slides that can be placed on the chip after separate culture of several days prior to exposure. This device allows the easy exposure of almost any kind of attached cells and the monitoring in real time while exposed to nsPEFs, opening large possibilities for potential use of the developed biochips.

### I. Introduction

Cell electroporation is a well-known technique that requires a short duration and an intense electric field to destabilize the plasma membrane. This technique is now mature and used in the field of cancer therapies in order to enhance the efficiency of targeted delivery of materials like drugs, antibodies or genes.<sup>1–3</sup>

Electroporation results from an interaction between the applied electric field and the cell plasma membrane, which increases its permeability. For a circulating cell (assumed to be spherical) the transmembrane potential  $\Psi_m$  is time dependent, following the charging of the plasma membrane, eqn (1).<sup>4,5</sup>

$$\Psi_m = f \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \cdot [1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}}] \quad (1)$$

where  $R$  represents the cell radius,  $f$  is function of the cell geometry, and  $\theta$  stands for the angle between the electric field  $E$

and the cell radius vector. The time constant  $\tau_m$ , characterizes the dynamics of the charge of the membrane.<sup>5</sup> The case of adherent cells is more complex, and some simulation study on cell tissues can be found in ref. 6.

In the case where conventional electroporation pulses are applied (such pulses having a few 100 μs duration), the transmembrane potential reaches  $\Psi_m = f \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta)$ , once  $t \gg \tau_m \approx$  order of μs. In this case, the cell membrane shields the electrical field that does not penetrate inside the cell, as long as the membrane is not permeabilised.<sup>7,8</sup>

With the recent technical progresses in the field of pulsed power equipment, the use of ultra short duration pulses (typically 3 to 10 ns) and high intensity (up to 100 kV cm<sup>-1</sup>), also called nanosecond pulsed electric fields (nsPEF), has been investigated. The nsPEFs, implying a high frequency electric field spectrum (from DC and above 100 MHz), are able to penetrate inside the cells as the plasma membrane is short-circuited at these working frequencies ( $t \ll \tau_m$ ). Hence, nsPEFs are able to disturb the membrane of intracellular organelles as internal vesicles, mitochondria<sup>9</sup> or endoplasmic reticulum.<sup>10,11</sup> Nevertheless, we are at the beginning of this very exciting area of manipulating cell interior whose mechanisms remain misunderstood.

In this context, researchers need tools allowing the real time visualization of cell perturbations induced by the application of

<sup>a</sup>SATIE, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 av du Pdt Wilson, Cachan, France

<sup>b</sup>Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Orsay, F-91405, France

<sup>c</sup>CNRS, Orsay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, F-91405, France

<sup>d</sup>Institut Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, F-94805, France

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work

nsPEFs. In particular, the microtechnologies offer high miniaturization capabilities allowing the generation of highly intense nanosecond electric fields, suitable to penetrate the intracytoplasmic compartment. Moreover, the use of transparent material to microfabricate such miniaturized devices allows real time imaging of the effects of such nanopulses.

In particular, the nanoporation of adherent cells requires a particular attention, as these cells need to be cultured and attached on a substrate to be in proper conditions mimicking usual cell environment, prior to nPEFs exposure. While many studies exist in the literature regarding the electroporation of circulating cells on a chip,<sup>12–16</sup> including our work,<sup>17</sup> very few developments of micromachined devices adapted to the electrical treatment of adherent cells can be found. Hence, we propose in this paper an original approach where adherent cells cultures, prepared *ex situ* on conventional glass slides, can be reported on our microfluidic device, thanks to a specific design. With this approach, one given microdevice can be re-used and easily cleaned for many experiments, where cells are cultured on glass slides prepared separately in large numbers. This concept of removable packaging is here advantageously exploited for adherent cells exposure to nsPEFs and for the real time monitoring of the effects of the nsPEFs, focusing on the generation of internal calcium concentration peaks resulting of membranes nanoporation.

## II. Microfluidic biochip design

In this section we describe the design of the new microfluidic device (Fig. 1(a)) that was specifically developed for the observation and study of the effects of nsPEFs on adherent cells.

### A. Impedance matching aspects

Due to the high voltages (up to 10 kV) applied to obtain the high field amplitude of the nsPEFs, the impedance matching with the

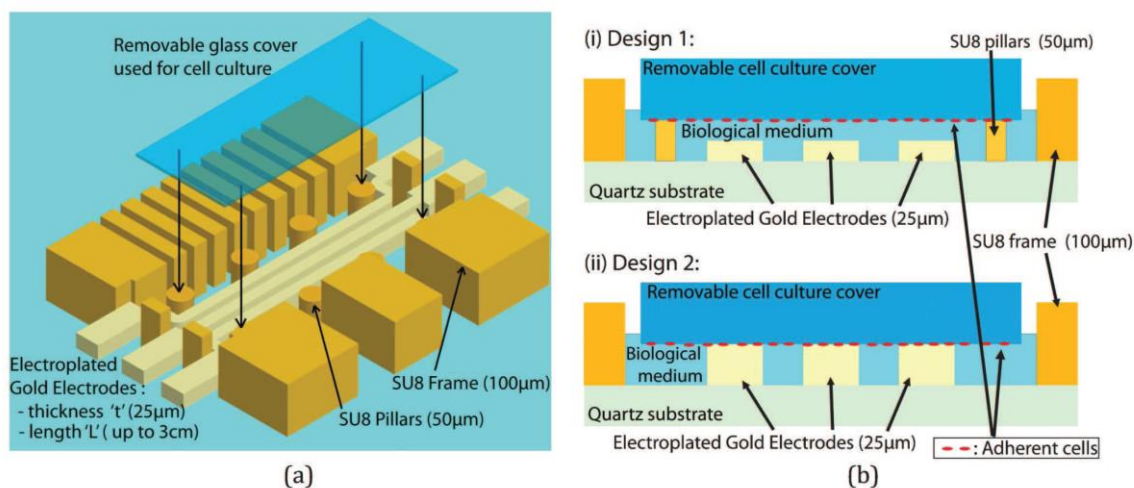
nanopulser is crucial in order to prevent any damages of the electronic components. Indeed, the level of reflections of the transmitted energy back to the nanopulser depends on this matching, which in addition directly affects the transfer of energy to the cells.<sup>18–20</sup>

As the electric field is applied to the biological medium with thick electroplated gold electrodes, the impedance is mainly governed by the physical properties of this medium. The propagation along the electrodes can be neglected for the considered frequency spectrum of the nsPEFs which energy is mainly located in the range (0–100 MHz), when 10 ns duration pulses are considered.<sup>18–20</sup> The medium is mainly conductive at low frequencies (for  $f < \frac{\sigma}{2\pi\epsilon}$ ) and capacitive for higher frequencies, where  $\sigma$  and  $\epsilon$  are the conductivity and permittivity of the medium, respectively.

The impedance matching cannot be achieved for all frequencies but can be optimized in a large frequency bandwidth, where the medium is considered as a pure conductance, and which includes the main energy frequency range of the nanopulses. To do so, the geometrical parameters of the device (thickness  $t$  of the electroplated electrodes, the distance  $d$  between these electrodes, the length  $L$  and height  $H$  of the micro channel) are adjusted to get the required 50  $\Omega$  impedance for the 0 to 200 MHz frequency bandwidth, suitable for the delivery of 10 ns nanopulses with the available nanopulser generator described in the experimental section.<sup>17–21</sup> While  $d$  and  $t$  are set to  $d = 150 \mu\text{m}$  and  $t = 25 \mu\text{m}$ , respectively,  $L$  and  $H$  depend on the chosen architecture (see next section).

### B. Removable packaging architecture

For adherent cells to be exposed to the nsPEFs solicitations, it is mandatory to let the cells incubate and adhere on the substrate prior to field exposure. At least 4 h incubation in sterile conditions, at 37 °C–5% CO<sub>2</sub>, is required. A cell culture directly



**Fig. 1** (a) Schematic representation of the device, involving electroplated gold electrodes in a transmission line configuration, and a thick SU8 resist frame for the centering of the removable glass cover. (b) The two designs of the microfluidic device with removable packaging for cells exposure to nsPEFs: (i) Design with 25  $\mu\text{m}$  thick electrodes, and 50  $\mu\text{m}$  thick resist micro-pillars to support the culture slide (ii) Design with 25  $\mu\text{m}$  thick electrodes and no pillars (arbitrary scales).



performed within the microfluidic device is quite achievable but leads to several constraints: i) only one or two exposures per day are possible, as 4 h are required for the adhesion and spreading of the cells; ii) a specific cleaning of the device is necessary after each experiment. The lifetime of the device is thus decreased, due to this cleaning procedure required.

In order to avoid the drawbacks mentioned above, we developed a specific packaging, well adapted to our case where adherent cells are exposed to nsPEFs within the microfluidic device. The solution that we propose involves the possibility of using a removable coverslip. Indeed, this strategy presents the advantage of allowing the culture on several cover slides in parallel while the biochip is available for short term (or even very short term) experiments. The cleaning of the biochip is highly facilitated as the cell adhesion is not promoted within the channel surfaces. Thus, the device lifetime is increased.

The structure that we developed is presented in Fig. 1(b). Two different configurations have been investigated, each of them including an external frame in thick resist (SU8, Microchem) that allows the positioning of the 12 mm  $\times$  32 mm culture cover slides above the metallic electrodes. Notches have been included in the SU8 layer to facilitate the slide removal after the nsPEFs application. Considering the first design (Fig. 1(b)i), cells are separated from the electrodes, and disposed at a distance controlled by micropillars height ( $H$ ) which are microfabricated in thick resist. Hence, this structure includes 25  $\mu$ m-high gold electrodes, and 50  $\mu$ m-high SU8 micro-pillars.

The second design (Fig. 1(b)ii), which was finally chosen for the experiments, possesses the same 25  $\mu$ m thick electrodes on which the removable slide covered with adherent cells is directly apposed. In this case, the length of the electrodes was adjusted ( $L = 3$  cm) to achieve the impedance matching, taking into account the thickness ( $t_c \approx 7$   $\mu$ m) of the cell layer cultured on the cover slide, and the conductivity ( $\sigma = 1.55$  S m $^{-1}$ ) of the medium used. The thickness of the cell layer was estimated from the geometrical properties of DC-3F cells (the cell type used in our experiments), and was confirmed by the actual measured impedance (see next section). Once the culture slide is positioned in the SU8 frame, two spring strips are used to maintain it on the biochip.

### C. Spatial homogeneity of the applied electric field pulses

The culture slide being positioned above the metallic electrodes, as shown in Fig. 1(b), the amplitude of the electric field depends on the location within the channel section. Hence, it is necessary to quantify the electric field attenuation to validate the feasibility of the cell nanoporation in this configuration. In Fig. 2(a), we compared the field distribution in the two design cases (with or without the 50  $\mu$ m resist pillars), using finite element analysis simulations performed with Comsol. We considered the thickness  $t_c$  of the cell layers.

This analysis shows that the variation of the electric field in a section of the microchannel remains quite acceptable in both structures, but that the best homogeneity (Table 1) is achieved with design 2 (without micro-pillars). Design 2 (25  $\mu$ m thick electrodes, no thick resist pillars) seems to be the most appropriate design, if the field homogeneity criteria in the microchannel is considered as the most important criterion (Fig. 2(a)ii, 2(b), and Table 1).

Nevertheless, the design 1 (involving the 50  $\mu$ m resist pillars) has the advantage of preventing any contact between the cells and the electrodes. Indeed, such contact might alter the cell viability (due to electric field edge effects visible on Fig. 2(b)ii).

## III. Materials and methods

### A. Fabrication process

Both proposed designs were fabricated on a commercial quartz substrate (ACM, France), as it is transparent, has good dielectric properties and presents good adhesion properties. The materials used for the fabrication are biocompatible. The metallic electrodes are made of electroplated gold as it is biocompatible and has a good conductivity ( $\sigma = 4.1 \times 10^7$  S m $^{-1}$ ). The microfluidic chamber is patterned with a thick photosensitive resist (SU8, MicroChem), broadly used in bio-microfluidic devices.

The process started with a quartz substrate (from ACM), which was pre-metallized with a Cr/Au layer whose thickness was 30 nm/150 nm, respectively. After a cleaning of the wafer with successively acetone, isopropanol, water baths and desorption at 150  $^{\circ}$ C, the gold thickness was increased up to 25  $\mu$ m. The gold was electroplated using a KAu(CN) $_2$  bath and a current density of 1.5 mA cm $^{-2}$ . The gold electrodes were then patterned using UV photolithography of S1805 resist, followed by gold and chromium chemical etching.

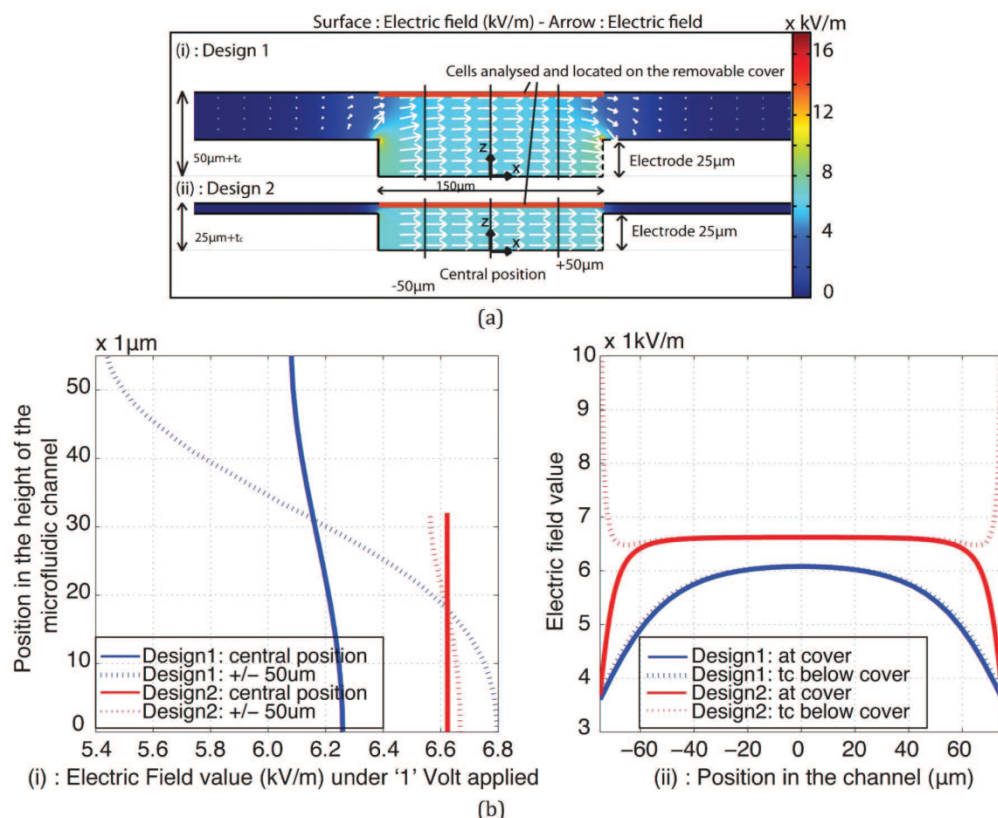
The microchamber was then fabricated on the electrodes by the structuring of an SU8 layer using photolithography. For the SU8 pillars design (prototype 1), a double SU8 layer was used to define the 50  $\mu$ m thick pillars and the 100  $\mu$ m thick SU8 frame. The first SU8 layer (SU8 2025) was spin coated to reach a thickness of 50  $\mu$ m (1700 rpm for 30 s), baked (3 min at 65  $^{\circ}$ C and 15 min at 95  $^{\circ}$ C), exposed to UV (390 mJ cm $^{-2}$ ) and post exposure baked (3 min at 65  $^{\circ}$ C and 15 min at 95  $^{\circ}$ C). The second SU8 layer (SU8 2075) was then spin coated to reach a final thickness of 100  $\mu$ m (2100 rpm for 30 s). The resist was baked (3 min at 65  $^{\circ}$ C and 15 min at 95  $^{\circ}$ C), exposed again (600 mJ cm $^{-2}$ ), post exposure baked (3 min at 65  $^{\circ}$ C and 15 min at 95  $^{\circ}$ C) and the two layers were simultaneously developed. Considering prototype 2 (without the pillars), only one layer of SU8 (SU8 2075) was spin coated to directly reach the targeted thickness of 100  $\mu$ m (2100 rpm for 30 s). The resist was then baked (5 min at 65  $^{\circ}$ C and 20 min at 95  $^{\circ}$ C), exposed to UV (600 mJ cm $^{-2}$ ) and post exposure baked (3 min at 65  $^{\circ}$ C and 15 min at 95  $^{\circ}$ C). The SU8 layer was finally developed to define the microfluidic chamber. Fig. 3 shows photographs of the fabricated biochips.

### B. Cell preparation

DC-3F cells (Chinese hamster lung fibroblast cells) were grown in MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g mL $^{-1}$  streptomycin. Cells were propagated at 37  $^{\circ}$ C in a humidified 5% CO $_2$  atmosphere. Cells were routinely passed every two days. All the chemicals were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

For the biological experiments, cells were cultured on glass slides for at least 4 h. In order to visualize the effect of nsPEFs on living cells, the slides were incubated for 30 min with the





**Fig. 2** (a) Electric field calculation by finite element analysis for the two designs developed for the nanoporation of adherent cells: (i) Design with the 50 μm resist pillars and (ii) Design without the micro-pillars. The cell layer is taken into account (estimated at  $t_c = 7 \mu\text{m}$ ). (b) Homogeneity of the electric field within the nanoporation channel (for 1 V): (i) depending on the  $z$  position in the microfluidic chamber and (ii) depending on the  $x$  position of cells on the glass slide (from one electrode side to the other). Blue curves correspond to design 1 (with micro-pillars), while red curves correspond to design 2 (without pillars). (b) displays the electric field dependence on the  $z$  position (Fig. 2(b)i) and the  $x$  position (Fig. 2(b)ii) in the microfluidic chamber. The cell layer cultured on the cover slide is confined between altitudes  $z = 50\text{--}57 \mu\text{m}$  in the case of prototype 1 and  $z = 25\text{--}32 \mu\text{m}$  for prototype 2 (providing the cell thickness does not exceed  $t_c = 7 \mu\text{m}$ ).

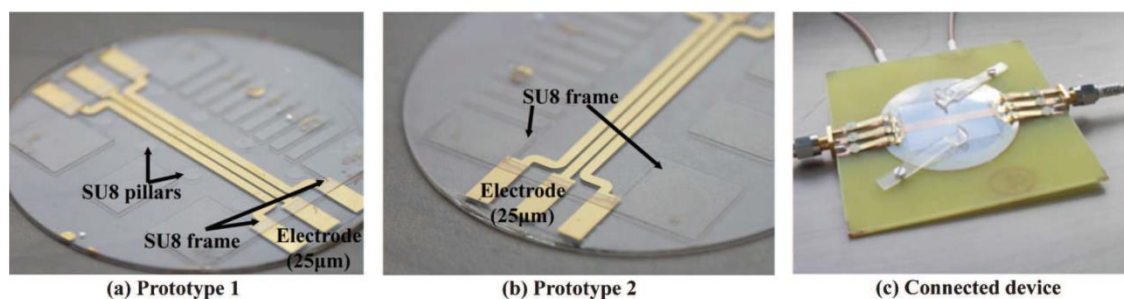
fluorescent calcium marker Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ) in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C. The slides were washed three times with PBS and placed on top of the chip (the cells being thus located inside the channel). Fluo-4 AM dye possesses acetoxymethyl groups (AM) allowing the molecule to enter the cells and preventing calcium binding outside of the cell. Once the marker is inside the cytoplasm, the AM groups are cleaved by endogenous esterases, resulting in both the trapping of the fluorophore and its activation. If the cytosolic calcium

concentration increases, Fluo-4 fluorescence increases. Hence, monitoring the fluorescence of exposed cells allows us to know whether organelle membranes or plasma membranes are affected by the nsPEF and become permeable to the calcium ions. Cells were exposed to a single 10 ns pulse of  $280 \text{ kV cm}^{-1}$ .

DC-3F cell images were taken with a Zeiss AxioCam Hrc camera on a Zeiss Axiovert S100 epifluorescence inverted microscope controlled through the Axio Vision 4.6 software (Carl Zeiss, Germany).

**Table 1** Spatial homogeneity of the electric field

	Homogeneity of the electric field as a function of the $z$ position in the microchamber		Homogeneity of the electric field as a function of the $x$ position in the microchamber, over 90% of the distance between the electrodes	
	Central position (0 μm)	Side position ( $\pm 50 \mu\text{m}$ )	In contact with the cover	$t_c$ (7 μm) below the cover
Design 1	2.85%	21.9%	28.9%	27.1%
Design 2	0.02%	1.55%	10.6%	2.01%



**Fig. 3** Photographs of the fabricated microfluidic devices. (a) prototype 1, with SU8 microstructured pillars and (b) prototype 2 without pillars; (c) general view of the device connected to the PCB (printed circuit board), with two springs to maintain the culture slide.

### C. Electrical set-up: nanosecond pulse generator and measurement

A commercial generator purchased from FID (FID GmbH, Model FPG 10-ISM10, Burbach, Germany) with an output impedance of  $50\ \Omega$  was used to treat the cells. It generates trapezoidal monopolar pulses with a full-width at half maximum of 10 ns.<sup>18–20</sup> The output voltage magnitude goes from 3 kV to 10 kV. The rising edge lasts between 0.4 and 0.6 ns. The falling edge lasts between 1 and 1.5 ns.

In order to characterize the incident and reflected signals in the exposure set-up, a tap-off (245 NMFFP-100, Barth Electronics Technology, USA) was connected between the generator and the biochip using two transmission lines.<sup>22</sup> The tap-off is a three-port device. The impedance of the mainline (*i.e.* the nsPEF-biochip line) is  $50\ \Omega$  whereas the impedance of the measurement port (*i.e.* the connection to the oscilloscope) is  $4950\ \Omega$ , allowing a voltage measurement with a 1 : 100 ratio. A Wavemaster 808 Zi 8 GHz oscilloscope (LeCroy, Courtaboeuf, France) was used for the measurements.

## IV. Results and discussion

Optimum architectures of the device have been investigated in order to ensure a good homogeneity of the cells exposure conditions within the microfluidic channel. Indeed, for this study concerning nsPEFs effects on adherent cells, that are attached on glass cover slides reported on the nanoporation device, nsPEFs should be very well controlled and spatially homogeneous.

As shown by finite element analysis, the homogeneity of the electric field is enhanced when the culture slide is directly reported on the  $25\ \mu\text{m}$  thick electrodes (prototype 2), as far as we examine cells that are not directly in contact with the electrodes. The  $25\ \mu\text{m}$  thick electrodes structure combined to  $50\ \mu\text{m}$  resist pillars (Prototype 1) gives satisfying but lower homogeneity for the electric field, as explained in section II.C. Therefore the prototype 2 ( $25\ \mu\text{m}$  thick electrodes, no pillars) has been employed to achieve the results presented thereafter.

To validate the possibility of exposing cells reported on the top of the electrodes, biological experiments have been carried out and in particular, we study the dynamics of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in response to the application of nsPEF. DC-3F cells were loaded with the calcium marker Fluo-4 AM. Cells were exposed to a single 10 ns pulse of  $280\ \text{kV cm}^{-1}$ . The profile of applied nsPEFs is reported in Fig. 4. As predicted, a good impedance matching is achieved; around 5% of the nsPEF is reflected back to the

nanopulser which gives an effective impedance of the chip equal to  $45\ \Omega$ . This slight difference could be interpreted as an underestimation of the cell layer height or some inhomogeneity in this height.

Concerning the cell exposure, recording started 100 s before the pulse to visualize the baseline of the fluorescence, and continued for 10 min after the nanopulse delivery. Fig. 5 reports typical results achieved under the experimental conditions reported here. As seen in Fig. 5(a), an increase in the Fluo-4 fluorescence in the presence of extracellular calcium, indicating a raise in the cytosolic calcium concentration, was observed. After 400 s the fluorescence was back to the baseline showing that the cells can recover this massive calcium release, probably through the activation of pumps and transporters.

The kinetics of calcium response is reported on Fig. 5(b) showing the immediate increase in fluorescence following the nanopulse delivery to the cells with a maximum value reached about 40 s after the nsPEF application. All the cells responded at the same time but the response amplitude was different from cell to cell (from a 0.5 fold increase to a 4 fold increase). Thus the nsPEFs applied to the DC-3F under the microdevice-associated experimental conditions actually generate a cytoplasmic calcium concentration transient increase.

Experiments were also performed in the absence of external calcium using this microdevice (cells treated in S-MEM, data not shown). It was still possible to generate calcium peaks showing that in this case, the internal calcium stored in the endoplasmic reticulum was involved in the generated cytosolic calcium peaks. This result is consistent with the work of Vernier *et al.* who showed in 2003<sup>10</sup> that nanopulses were able to permeabilize the cells endoplasmic reticulum. However, according experiments carried out by Silve *et al.*,<sup>21</sup> proving that it is possible to permeabilize the plasma membrane of the DC-3F cells with one single 10 ns trapezoidal monopolar pulse (at  $40\ \text{kV cm}^{-1}$ ), the calcium peaks reported in Fig. 5 could also be the consequence of the presence of external calcium in the reported experiments.

## V. Conclusion

An original microfluidic device dedicated to the application of nsPEFs to adherent cells and their real time monitoring has been developed and characterized in this work. The proposed device involves a removable packaging. Indeed, with such a packaging, the preparation of cell cultures on standard commercial slides

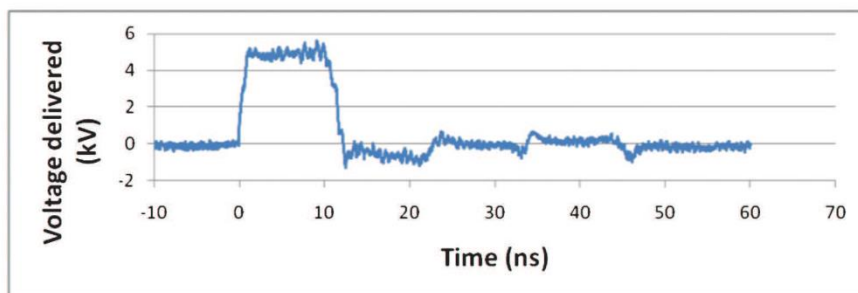


Fig. 4 recording of the applied nsPEFs.

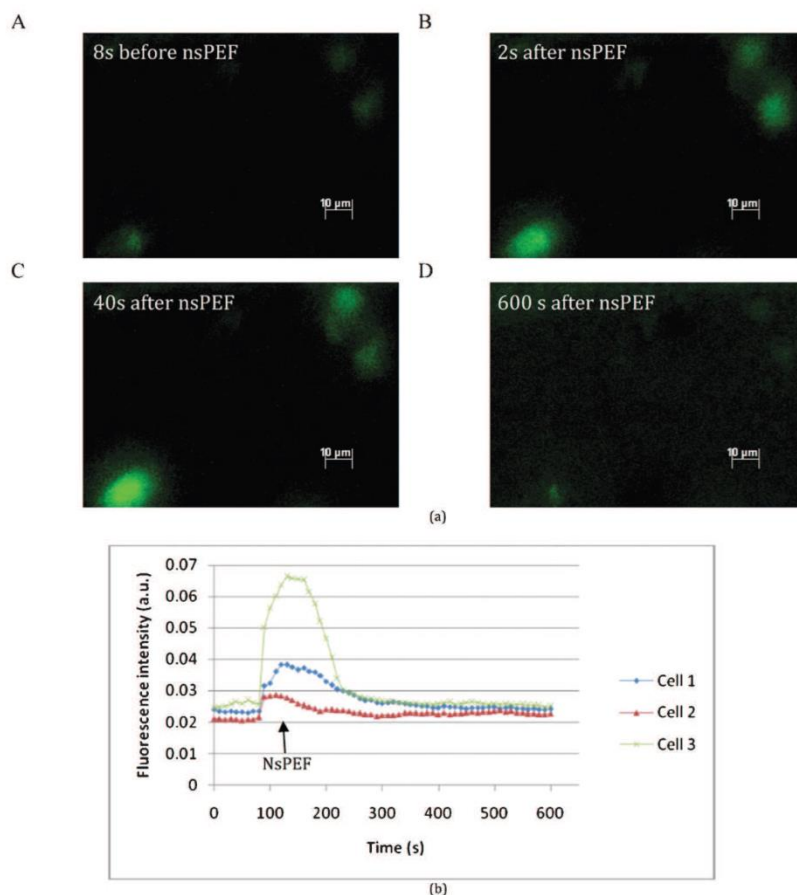


Fig. 5 (a) Real time imaging of a calcium peak from cells imaged every 10 s with a 500 ms exposure. Attached DC-3F cells were loaded with the calcium marker Fluo-4 (5  $\mu\text{M}$ ). A single 10 ns pulse of  $280 \text{ kV cm}^{-1}$  was delivered. A: 8 s before the nanopulse, B: 2 s after the nanopulse, C: 40 s after the nanopulse, D: 600 s after the nanopulse and (b) kinetics of the calcium response of the three cells observed in the previous figure.

remains possible, these slides being afterwards reported on the device for the nanopulses exposition and cell monitoring experiments. Two approaches have been compared in terms of microfabrication process and electric field homogeneity achieved in the microfluidic chamber. The efficiency of our device has been demonstrated with a successful study of the dynamics of the

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  in response to the application of nsPEF. The effect of extremely high amplitude and short duration electric pulses ( $280 \text{ kV cm}^{-1}$ , 10 ns) that could be applied for the first time to adherent cells were recorded in real time in our microdevice. Kinetics of calcium responses show an increase in fluorescence due to the nanopulse application.



These promising results pave the way for the development of micro and nano systems well adapted to a better understanding of nanoporation effects on living cells.

## Acknowledgements

This work was supported by the French National Agency through Nanoscience and Nanotechnology Program (Nanopulse-biochip no. ANR-08-NANO-024), CNRS, ENS de Cachan, Institut Gustave Roussy, University Paris-Sud, PRES Universud and CNANO Île de France.

## References

- 1 C. Domenge, S. Orlowski, B. Lubinski, T. De Baere, G. Schwaab, J. Belehradek Jr. and L. M. Mir, *Antitumor electrochemotherapy: New advances in the clinical protocol*, *Cancer*, 1996, **77**(5), 956–963.
- 2 M. Marty, G. Sersa, J. R. Garbay, J. Gehl, C. G. Collins and M. Snoj, *et al.*, Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOP (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study, *Eur. J. Cancer Suppl.*, 2006, **4**, 3–13.
- 3 L. M. Mir, M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy and J. M. Caillaud, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 4262–4267, DOI: 10.1073/pnas.96.8.4262.
- 4 H. P. Schwan, Electrical properties of tissue and cell suspensions, *Advances in Biological and Medical Physics*, 1957, **5**, 147–209.
- 5 T. Kotnik and D. Miklavcic, Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 670–679.
- 6 D. Miklavcic, K. Beravs, D. Semrov, M. Cemazar, F. Demsar and G. Sersa, The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues, *Biophys. J.*, 1998, **74**, 2152–2158.
- 7 T. Kotnik and D. Miklavcic, Theoretical Evaluation of Voltage Inducement on Internal Membranes of Biological Cells Exposed to Electric Fields, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 480–491.
- 8 T. R. Gowrishankar, A. T. Esser, K. C. Smith, R. S. Son and J. C. Weaver, Intracellular electroporation site distributions: Modeling examples for nsPEF and IRE pulse waveforms. Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE, 2011, 732–735.
- 9 T. B. Napatnik, Y. H. Wu., M. A. Gundersen, D. Miklavcic and P. T. Vernier, Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells, *Bioelectromagnetics*, 2012, **33**(3), 257–264.
- 10 P. T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, S. Salemi, C. M. Craft and M. A. Gundersen, Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **310**(2), 286–295.
- 11 G. L. Craviso, S. Choe, P. Chatterjee, I. Chatterjee and P. T. Vernier, Nanosecond electric pulses: a novel stimulus for triggering Ca<sup>2+</sup> influx into chromaffin cells via voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2010, **30**(8), 1259–1265.
- 12 Y. Huang and B. Rubinsky, Microfabricated electroporation chip for single cell membrane permeabilization, *Sens. Actuators, A*, 2001, **89**(3), 242–249.
- 13 Y. C. Lin, C. M. Jen, M. Y. Huang, C. Y. Wui and X. Z. Lin, Electroporation microchips for continuous gene transfection, *Sens. Actuators, B*, 2001, **79**, 137–143.
- 14 B. Le Pioufle, P. Surbled, H. Nagai, Y. Murakami, K. S. Chun, E. Tamiya and H. Fujita, Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection, *Mater. Sci. Eng., C*, 2000, **12**(1–2), 77–81.
- 15 W. G. Lee, U. Demirci and A. Khademhosseini, Microscale electroporation: challenges and perspectives for clinical applications, *Integr. Biol.*, 2009, **1**(3), 242–251.
- 16 S. F. Wang, J. X. Chen, M. T. Chen, P. T. Vernier, M. A. Gundersen and M. Valderrabano, Cardiac Myocyte Excitation by Ultrashort High-Field Pulses, *Biophys. J.*, 2009, **96**(4), 1640–1648.
- 17 C. Dalmay, J. Villemejane, V. Joubert, A. Silve, D. Arnaud-Cormos, O. François, L. M. Mir, P. Leveque and B. Le Pioufle, A microfluidic biochip for the nanoporation of living cells, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**(12), 4649–4655.
- 18 C. Dalmay, J. Villemejane, V. Joubert, O. François, L. M. Mir and B. Le Pioufle, Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultra-short pulses of electrical field to living cells, *Sens. Actuators, B*, 2011, **160**(1), 1573–1580.
- 19 A. Silve, R. Vezinet and L. M. Mir, Nanosecond-duration electric pulse delivery in vitro and in vivo: experimental considerations, *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, 2012, **61**(7), 1945–1954.
- 20 A. Silve, J. Villemejane, V. Joubert, A. Ivorra, L. M. Mir, Nanosecond pulsed electric field delivery to biological samples difficulties and potential solutions, in *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, ed. M. MarkovD. Miklavcic, A. PakhomovEds, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, pp. 353–368.
- 21 A. Silve, I. Leray and L. M. Mir, Demonstration of cell permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10 ns electric pulse, *Bioelectrochemistry*, 2012, **87**, 260–264.
- 22 M. Kanaan, S. El Amari, A. Silve, C. Merla, L. M. Mir, V. Couderc, D. Arnaud-Cormos and P. Leveque, Characterization of a 50 Ohms Exposure Set-up for High Voltage Nanosecond Pulsed Electric Field Bioexperiments, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2011, **58**(1), 207–214.



## **Article 3**

### **Electrical manipulation of the cytosolic calcium concentration and reproduction of the spontaneous calcium oscillations of human adipose-derived mesenchymal stem cells.**

De Ménorval MA, André FM, Silve A, Dalmay C, Mir LM

Article qui sera soumis prochainement.

Cet article utilise le dispositif décrit dans l'article précédent. Ce dispositif permet d'appliquer des impulsions nanoseconde de forte amplitude de champ sur des cellules adhérentes ou en suspension. Ces travaux ont été réalisés sur un modèle de cellules souches adultes humaines, les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux (haMSC). Ces cellules ont la propriété de pouvoir se différencier en différents types cellulaires ce qui en fait un candidat très prometteur dans le domaine de la régénération tissulaire.

Les haMSC ont la particularité de présenter des oscillations calciques liées à leur état de différenciation ainsi qu'à la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent. Ces oscillations impliquent le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire stocké dans le réticulum endoplasmique (RE) et le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Les cellules différenciées à partir des haMSC présentent moins d'oscillations calciques que les cellules haMSC maintenues dans un état multipotent. De plus, ces cellules se différencient spontanément après 20 à 30 doublements et la fréquence de leurs oscillations calciques diminue.

Il a été montré que l'inhibition de ces oscillations calciques par un courant faible continu en milieu de différenciation entraîne une différenciation plus importante. Cependant, ces oscillations n'ont pas été reproduites artificiellement et il serait donc intéressant de les recréer pour étudier la relation entre ces oscillations et l'état de différenciation des haMSC. C'est pour cela que, dans cet article, des impulsions électriques de 10 ns et de 100  $\mu\text{s}$  ont été utilisées (indépendamment) pour permettre de créer des pics calciques cytosoliques impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et/ou le  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RE.

En effet, les impulsions nanosecondes permettent de perméabiliser la membrane plasmique ainsi que les membranes des organites ce qui permet respectivement l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extérieur lorsqu'il y a du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RE. Les impulsions microsecondes permettent exclusivement la perméabilisation de la membrane plasmique.

L'utilisation de différentes amplitudes de ces deux types d'impulsions électriques en présence ou en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  a permis de générer différents types de pics calciques (à chaque fois une seule impulsion est nécessaire pour générer un pic calcique).

### **Pics calciques générés par des impulsions microsecondes**

En absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , des impulsions microsecondes de  $31 \text{ kV.m}^{-1}$  ne permettent pas de générer des pics calciques, ce qui montre que le réticulum endoplasmique n'est pas perméabilisé par ce type d'impulsions.

En présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , les impulsions microseconde permettent de générer des pics calciques d'amplitude et de durée similaires aux oscillations calciques spontanées des haMSC. Par contre, la forme de la base de ces pics dépend de l'amplitude de l'impulsion appliquée. Les oscillations spontanées commencent par une augmentation progressive de la concentration calcique cytosolique (correspondant au relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RE par l'intermédiaire du canal  $\text{IP}_3\text{R}$ ). Dans un second temps, ces oscillations présentent une augmentation plus rapide et plus importante de la concentration calcique cytosolique (correspondant à l'amplification du signal par des canaux de la membrane plasmique, les SOCC et les VOCC).

Cette forme est retrouvée lorsqu'une impulsion microseconde de faible champ électrique est délivrée sur les haMSC (entre  $15$  et  $25 \text{ kV.m}^{-1}$ ).

Cette forme de la base du pic est compatible avec l'hypothèse d'une faible entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire à travers la membrane amplifiée par les SOCC et les VOCC de la membrane plasmique.

Si une impulsion microseconde de plus forte amplitude est délivrée ( $31 \text{ kV.m}^{-1}$ ), la base du pic commence par une augmentation plus brutale de la concentration calcique que lors des oscillations spontanées. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  causée par les impulsions électriques (et donc par la perméabilisation de la membrane plasmique) est plus massive dans ce cas et que soit elle surpasse l'action des canaux SOCC et VOCC soit elle déclenche plus rapidement l'action de ces canaux et se superpose à l'amplification.

### **Pics calciques générés par des impulsions nanoseconde**

En l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , lorsqu'une impulsion nanoseconde de plus de  $9,5 \text{ MV.m}^{-1}$  est délivrée, un pic calcique est généré par le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RE. Plus l'amplitude de l'impulsion est importante, plus l'amplitude du pic induit est importante. Une impulsion de  $10 \text{ ns}$  et d'amplitude de l'ordre de  $17\text{-}21 \text{ MV.m}^{-1}$  permet de générer une impulsion dont l'amplitude et la forme est similaire aux oscillations calciques (la durée semble plus longue). Si des impulsions d'amplitude plus importantes sont délivrées, il y a une augmentation brutale à la base du pic calcique (comme lorsque des impulsions microsecondes de

31 kV.m<sup>-1</sup> sont délivrées). Comme il n'y a pas de Ca<sup>2+</sup> externe dans ce cas, les SOCC et les VOCC ne sont pas impliqués dans ce mécanisme.

En présence de Ca<sup>2+</sup>, l'application d'une impulsion de 10 ns de l'ordre de 9 MV.m<sup>-1</sup> permet de générer des petits pics calciques n'impliquant pas l'amplification par les SOCC et les VOCC. Seul le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire semble impliqué dans ce cas puisque pour des champs électriques équivalents, il n'y a pas de génération de pics calciques en l'absence de Ca<sup>2+</sup>. Pour des champs plus élevées (environ 11-13 MV.m<sup>-1</sup>) le Ca<sup>2+</sup> externe ainsi que celui stocké dans le RE est impliqué et il est possible de recréer des pics calciques dont la base est similaire aux oscillations spontanées. Au-dessus de 17 MV.m<sup>-1</sup>, les pics présentent une augmentation brutale à leur base même si l'amplitude et la durée des pics sont similaires aux oscillations calciques.

De plus, cet article suggère que le champ électrique nécessaire à la perméabilisation de la membrane plasmique est inférieur à celui nécessaire à la perméabilisation du RE.

En conclusion, cet article montre donc différents protocoles permettant de générer des pics calciques cytosoliques impliquant soit seulement le Ca<sup>2+</sup> externe, soit seulement le Ca<sup>2+</sup> stocké dans le RE, soit les deux et en utilisant une amplification du signal calcique par les SOCC et les VOCC ou non ce qui permet de micromanipuler finement le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.





## **Electrical manipulation: a new flexible tool to micromanipulate cytosolic calcium concentrations and to generate spontaneous-like calcium oscillations in human mesenchymal stem cells.**

Marie-Amelie de Menorval <sup>1,2,3</sup>, Franck Andre <sup>1,2,3</sup>, Aude Silve <sup>1,2,3,4</sup>, Claire Dalmay <sup>5,6</sup> and Lluís M. Mir <sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anti-cancéreuses, UMR 8203, Orsay, France, <sup>2</sup> CNRS, Orsay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anti-cancéreuses, UMR 8203, Orsay, France, <sup>3</sup> Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anti-cancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France, <sup>4</sup> Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute for Pulsed Power and Microwave Technology (IHM), 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany, <sup>5</sup> SATIE, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, <sup>6</sup> Université de Limoges, Institut 145 GEIST, EA 3842 "Homéostasie Cellulaire et Pathologies", Faculté de Médecine, 87025 Limoges Cedex, France,

**Authors contribution:** M.A.M.: data collection and assembly, data analysis and interpretation, and manuscript writing; F.A.: conception and design, data collection and interpretation; A.S.: Conception and design; C.D.: conception and design (microdevice); L.M.M.: conception and design, data analysis and interpretation, writing and final approval of manuscript.

**Correspondance:** Lluís M. Mir, CNRS UMR 8203-Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif cedex, France. Telephone: +33142114792; Fax: +33142115245; e-mail: [luis.mir@gustaveroussy.fr](mailto:luis.mir@gustaveroussy.fr).

## **Abstract**

Human adipose mesenchymal stem cells (haMSCs) are multipotent adult stem cells of great interest in regenerative medicine or oncology. They also present spontaneous calcium oscillations related to cell cycle progression and differentiation but the correlation between these phenomena is still unclear. Indeed, it is difficult to mimic haMSCs spontaneous calcium oscillations with classical chemicals. However, pulsed electric fields (PEFs) can permeabilize plasma and/or organelles membranes depending on the applied pulses and generate cytosolic calcium peaks by recruiting internal or external calcium stores. We show that with 100  $\mu$ s PEFs and 10 ns PEFs it is possible to mimic haMSCs spontaneous calcium oscillations (same amplitude, duration and shape). In conclusion, PEFs could be a tool to micromanipulate cytosolic calcium concentrations. This tool can be switched on and off

instantaneously, contrary to chemicals agents, which can be useful for further investigation of the role of calcium oscillations in hMSCs differentiation.

## Introduction

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) have the ability to differentiate into different cell types including adipocytes, chondroblasts and osteoblasts<sup>324, 325, 369</sup>. Human adipose-derived MSCs (hMSCs) are very similar to the bone marrow-derived ones<sup>324</sup> but hMSCs are easier to collect making them promising candidates for cell therapy.

Even if the differentiating protocols using chemical to differentiate hMSC into adipocytes<sup>327, 328, 329, 330, 331</sup>, chondrocytes<sup>335, 336, 337</sup> and osteocytes<sup>332, 333, 334</sup> are well known, differentiation takes time (from 15 days to 1 month)<sup>327</sup> and cannot produce all cell types. Furthermore, hMSCs spontaneously differentiate after 20 to 30 population doublings and lose their multipotency<sup>324, 338, 339</sup>.

HMSCs present spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations implicating (i) endoplasmic reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$  channels like the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) and plasma membrane (PM)  $\text{Ca}^{2+}$  channels as well as (ii) store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOCCs) and (iii) voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VOCCs)<sup>339</sup>. These oscillations seem to be controlled by the  $\text{Ca}^{2+}$  release-recapture ER mechanisms amplified by the entry of external  $\text{Ca}^{2+}$  through PM  $\text{Ca}^{2+}$  channels<sup>339</sup>. Sun *et al.* reported that differentiated hMSCs present less  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations than undifferentiated hMSCs and that blocking these oscillations by using a 10 V/m continuous electric field (EF) facilitates differentiation into osteogenic lineage<sup>370</sup>. The correlation between these oscillations and the differentiation process is still unclear.

Microsecond pulse electric field ( $\mu\text{sPEF}$ ) of about 100 kV/m are commonly used in the electroporation field to induce PM permeabilization to different types of molecules (small ions<sup>371</sup>, drugs<sup>59</sup>, DNA<sup>372</sup>). The higher the EF, the greater the permeabilization<sup>140</sup>. Since a decade, a new type of PEFs has been used: the nanosecond PEFs (nsPEFs) that are 10 000 fold shorter in duration and 300 fold higher in amplitude.

P.T. Vernier and colleagues showed that nsPEFs can generate cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  peaks by permeabilizing PM and internal membranes such as the ER membranes, allowing the release of ER  $\text{Ca}^{2+}$  stored to the cytoplasm<sup>56</sup>. Application of  $\mu\text{sPEFs}$  can only permeabilize the PM and also induce  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes by permitting external  $\text{Ca}^{2+}$  entry<sup>17</sup>.

The aim of this work was to develop a really flexible way to micromanipulate cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations that could be switched on and off on demand and to study the possibility to mimic spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in hMSCs using nsPEFs or  $\mu\text{sPEFs}$ . It could be used to explore the influence of the generated  $\text{Ca}^{2+}$  peaks on the natural  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations.

## Materials and methods

### Cells and culture conditions

HaMSCs were isolated from lipoaspirates of individuals that gave informed consent for the use of these samples<sup>328, 373</sup>. The cells were grown in DMEM (Dulbelco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The cell culture chemicals were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Cells were propagated at 37°C in a humidified 5% carbon dioxide atmosphere by passing them every 3-4 days (one passage corresponding to one doubling time of the population). The multipotency capabilities of the cells were assessed by submitting them to differentiation conditions as reported in André *et al.*<sup>374</sup> (data not shown). Two different media were used in the experiments: complete DMEM and S-MEM (Suspension Minimal Essential Medium). DMEM contains 1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  whereas S-MEM does not contain  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Nanosecond pulse generator and measurement.

A commercial generator purchased from FID (FID GmbH, Model FPG 10-ISM10, Burbach, Germany) was used to treat the cells. It generates trapezoidal monopolar pulses of 10 ns. The generator and the measurement protocol are described in Dalmay *et al.*<sup>375</sup>.

### Nanopulse exposure device.

The exposure devices were microchambers with parallel gold electrodes, 25 µm thick, with a gap between the electrodes of 300 µm or 150 µm. The biochip substrat was in quartz and the channel was about 3 cm long and 25 µm deep. This device, which was compatible with a laboratory-made microscope stage, has been described in Dalmay *et al.*<sup>375</sup>.

### Microsecond pulse generator and electrodes.

Electric pulses of 100 µs were generated using a Cliniporator<sup>TM</sup> (Igea, Carpi, Italy). The pulse generator was connected to two parallel stainless steel rods of 1 mm diameter, 4 mm apart that were shaped to enter a 24 plate well and used as electrodes. The whole system was installed on an inverted microscope (see below).

### Imaging and images treatment.

Cells were cultured on glass cover slides for at least 24 hours to obtain well spread out cells. In order to visualize the effect of the nsPEF on living cells, the cells were incubated with 5µM of  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent marker, Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ , Invitrogen) for 30 min in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C in complete DMEM. To easily localize the cells, the incubation buffer also contained 375 nM of the nuclear fluorescent dye Hoechst

33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$ , Invitrogen). There is no interference between Fluo-4 and Hoechst 33342 fluorescence because their emission wavelengths are separated enough. The slides were washed three times with PBS (Phosphate Buffered Saline), turned upside down and placed on the top of the chip filled with complete DMEM or S-MEM (the cells being thus located inside the channel). Fluo-4 AM dye possesses acetoxymethyl groups (AM) allowing the molecule to enter the cell and preventing that  $\text{Ca}^{2+}$  binding occurs outside of the cell. Once the marker is inside the cytoplasm, the AM groups are cleaved by endogenous esterases resulting in both the trapping of the fluorophore and its activation. If the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration increases, Fluo-4 fluorescence increases. Images of haMSCs were taken every 10 s for 10 to 40 min with a Zeiss AxioCam Hrc controlled by the Axio Vision 4.6 software (Carl Zeiss, Germany) on a Zeiss Axiovert S100 epifluorescence inverted microscope. The pulses were always delivered after at least 5 min of observation and 2 s before the next image.

The nuclear dye Hoechst 33342 was used to track the cells during videomicroscopy. Indeed, nuclei were recognized and the individual cells tracked using the Cell Profiler software (Broad Institute, Cambridge, USA), allowing the automatic measurement of the fluorescence intensity signal of each cell on every image. Curves were plotted with a Matlab program.

All the observations were done at  $37^\circ \text{C}$  with 5% of  $\text{CO}_2$ .

The minimum opening time of the shutter for the fluorescent light was about 500 ms. In order to decrease the light energy applied on the cells, a 90% density Filter Thorlabs (NE110B, Maisons-Lafitte, France) was used.

## Determination of the EF amplitudes needed to permeabilize $\text{Ca}^{2+}$ internal stores and PM

In order to determine the field amplitude needed to permeabilize haMSCs in the presence or in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  and to compare the shapes of the responses, different increasing field amplitudes were applied on the same cells of a coverslide. Indeed, it could be difficult to compare the responses on totally different cells because of the intercellular variabilities. On each group of cells, 7 to 8 PEFs of 10 ns were applied with an interval of 300 s. The range of field amplitudes was from 2.5 MV/m up to 40 MV/m. The threshold values determined using these sequences of increasing field amplitude were verified later on cells exposed only to the permeabilizing field amplitudes.

## Statistics plotting

On the box plot, minima and maxima are represented at the ends of the whiskers. The rectangle is defined by the median and by the first and the third quartile of the sample.

## Results

### Follow-up of the spontaneous $\text{Ca}^{2+}$ oscillations in haMSCs.

Undifferentiated HaMSCs present asynchronous spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations viewable by a labeling with Fluo-4 (Fig. 1. a and b). Figure 1.c shows the stable repetition frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  variations of one cell displaying 34 peaks in 1800 s ( $\approx 53$  s between each  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation), extracted from the videomicroscopy data. Even if for each cell the rhythm of the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations was rather stable, there was a large intercellular variability in the interval between two oscillations which is in agreement with the idea of asynchronous oscillations (Fig. 1.d). The mean interval between two oscillations was  $144.2 \text{ s} \pm 124.2 \text{ s}$ , mean  $\pm$  SD ( $n=45$  cells). The maximum interval observed was 514.3 s and the minimum was 47.37 s.

### Generation of $\text{Ca}^{2+}$ peaks using nsPEFs

Since one of our goals was to mimic the spontaneous oscillations with only one single PEF of 10 ns with high amplitude, different magnitudes of the PEFs were tested on adherent cells with or without  $\text{Ca}^{2+}$  in the external medium.

Figure 2.a shows that in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , a single 10 ns pulse of 7.5 MV/m was needed to induce a cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase showing a permeabilization of the adherent haMSCs ( $E_{\text{PM}}^0$ ) and that 16.8 MV/m were needed to induce a  $\text{Ca}^{2+}$  peak in 100% of the haMSCs ( $E_{\text{PM}}^{100}$ ). In this case,  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes can cross PM and/or organelles membranes.

In the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.b), 9.5 MV/m were needed to visualize a cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase ( $E_{\text{org}}^0$ ) and 21.5 MV/m were needed to observe a  $\text{Ca}^{2+}$  peak in 100% of the haMSCs ( $E_{\text{org}}^{100}$ ). In that case, mobilized  $\text{Ca}^{2+}$  can only be internally stored  $\text{Ca}^{2+}$  showing permeabilization of organelles.

With or without external  $\text{Ca}^{2+}$ , the increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was gradual for EFs of respectively 11-13 MV/m and 17-21 MV/m. For higher EF amplitudes, the peaks started with a sharp raise. The EF needed to generate a  $\text{Ca}^{2+}$  peak was therefore lower in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  showing that PM was easier to permeabilize than organelles.

With external  $\text{Ca}^{2+}$ , a response was observed for EF amplitudes of more than 7.5 MV/m. However, to start to get amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  peak comparable with the spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, an EF magnitude of about 11-13 MV/m was needed.

On figure 2.c and d, two different cells from two experiments, representative of the general cell behavior, were exposed to 7 nsPEFs increasing from 2.7 MV/m to 36 MV/m with or without external  $\text{Ca}^{2+}$ . In the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , no  $\text{Ca}^{2+}$  peak was induced by the application of a 2.7 MV/m nsPEF. A 8.8 MV/m nsPEF induced small  $\text{Ca}^{2+}$  peaks whereas a 13 MV/m

nsPEF induced a higher  $\text{Ca}^{2+}$  peak which started gradually (similar to the spontaneous oscillations). From 17 to 36 MV/m cells presented  $\text{Ca}^{2+}$  peaks starting with sharp raises. In the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , no effects were seen when one 10 ns nsPEF of 2.7 MV/m and 8.9 MV/m were applied (Fig. 2 b and d). A nsPEF of 13 MV/m induced a small  $\text{Ca}^{2+}$  response. With EFs from 17 to 21 MV/m  $\text{Ca}^{2+}$  peaks presented gradual increases at the beginning. For EFs of 28 MV/m cells presented  $\text{Ca}^{2+}$  peaks with increasing amplitudes and sharp raises at the beginning. For the application of a 36 MV/m nsPEF, the amplitude of the responses slightly decreased. To confirm that there was no additive effect due to the protocol described above, coverslips were also exposed to only one 10 ns pulse of different EF amplitudes from 10.2 to 17.6 MV/m, in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , or from 15 to 24 MV/m, in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (data not shown). Different EF amplitudes were applied. The percentage of responding cells at each EF amplitude fully fit with the results presented on figure 2, showing that there was no additive effect due to the application of several nsPEFs, at least when a gap of 300 s between two consecutive nsPEFs was respected.

On figure 3, 39 of the 47 examined cells responded to the PEF (83% of the observed cells) by an increase in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. With external  $\text{Ca}^{2+}$ , EF of 11 MV/m allowed reproducing  $\text{Ca}^{2+}$  peaks with comparable amplitude and duration as the spontaneous ones without stopping the spontaneous oscillations (Fig. 3.a). If nsPEFs were delivered during the decreasing time of the spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  peaks, cells still showed an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Fig. 3.a and b). But, there was no effect if the nsPEF was delivered during the rising step of the spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations (Fig. 3.c). On figure 3.d, each nsPEF occurred between two spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and generated a  $\text{Ca}^{2+}$  peak (of smaller amplitude, in this particular cell, compared to the spontaneous oscillations) without stopping the spontaneous oscillations.

HaMSCs in suspension were also studied without external  $\text{Ca}^{2+}$  (S-MEM) and also presented  $\text{Ca}^{2+}$  peaks in response to nsPEFs (Fig. 4). Each time a nsPEF with high enough amplitude was applied, an immediate and sharp rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was observed due to the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the internal stores (mostly the ER). Amplitude of the second peak was 10 fold smaller than the first one whereas PEF was identical. Even a higher EF (for example 24 MV/m) delivered after 3 nsPEFs of 20 MV/m did not generate higher  $\text{Ca}^{2+}$  peak, and did not even stop the progressive decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  peaks amplitude.

## Generation of $\text{Ca}^{2+}$ peaks using $\mu\text{sPEFs}$

Reproduction of spontaneous oscillations (same amplitude, shape and duration) was achieved using one PEFs of 100  $\mu\text{s}$  and 15-25 kV/m. However, not all the cells were responding. The lower the EF, the lower the percentage of cells presenting a  $\text{Ca}^{2+}$  response

(Supplementary Table 1). Interestingly, with these low amplitude fields (15-25 kV/m), some responding cells presented a gradual increase at the beginning of the peak (Table 1, Supplementary data), like the spontaneous oscillations.

One single 100  $\mu$ sPEF of 31 kV/m induced a  $\text{Ca}^{2+}$  peak in 100% of the haMSCs (due to external  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the PM) with the same amplitude and duration but not the same shape of the beginning of the peaks as the spontaneous ones (Fig. 5). The spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  peaks started with a gradual increase whereas  $\text{Ca}^{2+}$  peaks produced by a 31 kV/m  $\mu$ sPEF presented a sharp rise in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

Spontaneous oscillations were not interrupted by the application of six PEFs of 100  $\mu$ s (Fig. 5.b). The addition of propidium iodide (PI) 30 min after the last electrical stimulation showed no PI uptake revealing that cells were still alive 30 min after the treatment (data not shown).

In the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (S-MEM) there was no increase in  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence by applying the same micropulses (100  $\mu$ s, 31kV/m, data not shown) proving that external  $\text{Ca}^{2+}$  was involved.

## Discussion

Our observations reveal that nsPEFs and  $\mu$ sPEFs can provoke  $\text{Ca}^{2+}$  peaks similar to the spontaneous oscillations (same amplitude and duration depending on the EF amplitude and on the presence or the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ ).

### Follow-up of the spontaneous $\text{Ca}^{2+}$ oscillations in haMSCs.

Some haMSCs were not presenting  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations during the observation time (2 % in Fig. 1.d), some were presenting numerous peaks (Fig. 1.c) or just a few ones (data not shown). Since there is no reason for cell cycle synchronization in our cultures and since it has been shown that hMSCs display  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations only during the G1/S phases of the cell cycle<sup>376</sup>, the non oscillating cells could be the ones out of the G1 or S phases during the observation.

### Generation of $\text{Ca}^{2+}$ peaks using nsPEFs

NsPEFs were used to generate artificial  $\text{Ca}^{2+}$  peaks. Different publications presented  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by nsPEFs in non excitable cells. It has been shown that 10 nanopulses of 30 ns at 2.5 MV/m<sup>56</sup> or a single 60 ns pulse of 2.5 to 10 MV/m<sup>377</sup> can cause  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER. In the former case, nsPEF affected organelles without affecting PM  $\text{Ca}^{2+}$  channels<sup>56</sup>. We present here, for the first time, that a single nanopulse as short as 10 ns can cause a  $\text{Ca}^{2+}$  release in non excitable cells.

Application of nsPEF during the rising part of a spontaneous oscillation does not display any additional effect (Fig. 3.c). With this amplitude of EF (11.3 MV/m) and with external  $\text{Ca}^{2+}$ , it is



possible that the spontaneous and the induced oscillations are partly using the same mechanisms, explaining why there is no additive effect.

### Shapes of the induced $\text{Ca}^{2+}$ peaks and relationship with the origin of the $\text{Ca}^{2+}$ mobilized

Present knowledge assumes that there is no permeabilization of organelles membranes (therefore no induced  $\text{Ca}^{2+}$  peak), when a  $\mu\text{sPEF}$  of 31 kV/cm is applied without external  $\text{Ca}^{2+}$  and it was confirmed by our observations. When the same  $\mu\text{sPEF}$  was applied in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  peaks were induced with same amplitude and duration as spontaneous oscillations. The only difference was the very sharp rise at the beginning of the peaks (Fig. 5) whereas spontaneous oscillations started progressively with a round curve which is in agreement with the hypothesis described by Kawano *et al.*<sup>339</sup> (oscillations initiated by the release of ER  $\text{Ca}^{2+}$  stored and amplified by  $\text{Ca}^{2+}$  entry through PM  $\text{Ca}^{2+}$  channels). This difference can be explained by the hypothesis that, here, the  $\text{Ca}^{2+}$  peak is due to a massive  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the  $\mu\text{sPEF}$ -permeabilized PM (proved by the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  peak when there is no external  $\text{Ca}^{2+}$ ).

When  $\mu\text{sPEF}$  of lower amplitude (from 15 to 25 kV/m) were applied on haMSCs, some of the responding cells presented the same shape at the beginning as the spontaneous oscillations. These conditions seem to be the best to reproduce spontaneous oscillations.

When nsPEFs of about 11-13 MV/m were applied, with external  $\text{Ca}^{2+}$ , gradual increases at the beginning of the peaks were observed (Fig. 2.c and 4). For these EF amplitudes part of the cells were presenting  $\text{Ca}^{2+}$  peaks with the same amplitude as the spontaneous ones (Fig. 3.a) and some others showed smaller  $\text{Ca}^{2+}$  response (Fig. 3.d). When nsPEFs of 11 MV/m and more (or  $\mu\text{sPEFs}$  from 15 kV/m to 30 kV/m) were applied with external  $\text{Ca}^{2+}$ , the amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  response did not seem to completely depend on the field amplitude. It seems that the amplitudes are either really low or as high as the ones of spontaneous oscillations showing that an amplification mechanism using the SOCCs and the VOCCs can occur if the initially PEF-induced  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilization is large enough.

When higher EF amplitudes were used (more than 13 MV/m),  $\text{Ca}^{2+}$  peaks started more sharply.

In the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , internal and external  $\text{Ca}^{2+}$  stores can be recruited excepted for EFs of less than 9.5 MV/m that involved only the external  $\text{Ca}^{2+}$  (no  $\text{Ca}^{2+}$  peak if there was no external  $\text{Ca}^{2+}$  at this EF amplitude).

In the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ , results showed that the higher the EF, the higher the  $\text{Ca}^{2+}$  peak amplitude (there is no amplification system, Fig. 2.d). Considering the shape of the  $\text{Ca}^{2+}$  response, nsPEFs of about 17-21 MV/m induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses of smaller amplitude than

the spontaneous oscillations but with similar gradual increases at the beginning. Indeed, for higher EFs,  $\text{Ca}^{2+}$  peaks started more sharply.

Without external  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  peaks are due to the release of internally stored  $\text{Ca}^{2+}$  (mostly the ER). A depletion of the internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores can explain the decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  peaks amplitude in response to several nsPEFs of 20MV/M or 24MV/m (Fig. 4) or to the last nsPEF applied in figure 2.d. According to the Kawano hypothesis<sup>339</sup>, without external  $\text{Ca}^{2+}$ , refilling of the calcium stores is not possible. Furthermore, this type of PEFs can permeabilize the PM leading to a leakage of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  (included the  $\text{Ca}^{2+}$  released from the stores) enhancing the internal stores depletion.

In each case, haMSCs recovered in less than two minutes, meaning that  $\text{Ca}^{2+}$  could no longer be mobilized across the membrane and that induced electropermeabilization was fully reversible.

### Spontaneous and PEF-induced $\text{Ca}^{2+}$ flows in haMSCs

The different mechanisms involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  peaks detailed below are summarized in figure 6. Mechanisms of spontaneous oscillations are described in agreement with Kawano *et al.* hypothesis<sup>339</sup> (Fig. 6.a). Besides, it is known that nsPEFs can permeabilize the ER membrane<sup>56</sup> and the PM<sup>378, 379</sup> and that the electropermeabilization is done through the lipid bilayer (according to molecular dynamics simulations<sup>158, 161</sup> and because lipid vesicles can be permeabilized<sup>14, 25</sup>).

Application of  $\mu\text{sPEFs}$  of 15 to 25 kV/m can induce  $\text{Ca}^{2+}$  peaks mimicking the spontaneous oscillations (same shape, same amplitude and duration, Fig. 6.b). Application of  $\mu\text{sPEFs}$  of higher EF amplitude (31 kV/m) mostly led to  $\text{Ca}^{2+}$  peaks with a sharp  $\text{Ca}^{2+}$  rising (high field case in figure 6.b) due to the PM permeabilization to  $\text{Ca}^{2+}$  without organelle permeabilization (because no  $\text{Ca}^{2+}$  peaks were induced without external  $\text{Ca}^{2+}$  with these PEFs) which is in agreement with the classical models of electropermeabilization.

Without external  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6.c), nsPEF led to  $\text{Ca}^{2+}$  peaks only due to the release of internally stored  $\text{Ca}^{2+}$  (mostly in ER). The higher the EF amplitude, the higher the response. When low EFs were applied (lower than 17 MV/m),  $\text{Ca}^{2+}$  peaks started gradually whereas the application of higher EFs (higher than 17 MV/m) generated sharp  $\text{Ca}^{2+}$  rises because of extended electropermeabilization inducing massive  $\text{Ca}^{2+}$  release.

When nsPEFs of low amplitude (less than 11 MV/m) were applied with external  $\text{Ca}^{2+}$ , PM was permeabilized inducing slight increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6.d.1). When higher EFs were applied (from 11 MV/m to 13 MV/m) the  $\text{Ca}^{2+}$  increases were more important and had a similar shape of the beginning of the peak to spontaneous oscillations (Fig. 6.d.2, moderate

field case). When even higher EFs were applied (from 17 to 40 MV/m) haMSCs presented  $\text{Ca}^{2+}$  peaks with sharp rising.

In this two latter cases (for EFs of more than 11 MV/m) , we can speculate that there is a threshold phenomenon in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration inducing the activation of the SOCCs and the VOCCs, leading to an  $\text{Ca}^{2+}$  entry amplification because the maxima of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  peaks were mostly constant (for each cell). Figure 2.c shows that in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  the  $\text{Ca}^{2+}$  peak is either quite low or really higher with no intermediate value which is in agreement with the involvement of amplification due to SOCCs and VOCCs. But, regarding to the intercellular variability in our experiments, it is not possible to determine this threshold. The sharp rising seen with high EF (more than 17 MV/m) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  could be explained by the fact that membranes permeabilization is great enough to lead to a fast and massive increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  almost instantaneously amplified by the SOCCs and the VOCCs. The amplification mechanism may control the maxima of the peaks because these peaks mostly reached the same maximum as the ones showing gradual increases at the beginning.

After these types of  $\text{Ca}^{2+}$  perturbations, the  $\text{Ca}^{2+}$  was pumped back to the ER through SERCA pumps (sarco/ER  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) and released to the external medium through the NCX channel ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger) and PMCA (PM  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase ).

## Lower EFs are needed to permeabilize PM than organelles membranes.

A decade ago, it was thought that nsPEFs would only permeabilize organelles but more recently it has been shown that nsPEFs were also permeabilizing PM<sup>378</sup>. It is still commonly assumed that lower EFs are needed to permeabilize organelles than PM but this work shows that, with these cells and 10 ns pulses, lower fields are necessary to permeabilize PM to  $\text{Ca}^{2+}$  than organelles. Interestingly, the comparison is made here using the same marker of low molecular weight (the  $\text{Ca}^{2+}$ ) and the same system to visualize it (Fluo-4 AM used always under the same conditions). Our conclusion can be supported by the recent work of Semenov *et al.*<sup>57</sup> also reporting that it is easier to permeabilize PM than organelles

The size of the permeabilization dye and the sensitivity of the techniques used are really important parameters that should be taken in account. Indeed, it has been shown in another study<sup>95</sup> that the notion of chemical permeabilization strongly depends on the dye and the technique of observation used ( $\text{Ca}^{2+}$  entry is seen for less intense permeabilization conditions than Yo-Pro, a classical permeabilization dye).

We developed new flexible tools to control internal  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations on demand and to reproduce spontaneous hMSCs oscillations (nsPEFs and  $\mu\text{sPEFs}$ ). The important parameters (amplitude, duration and shape of the gradient in concentration) in the regulation of cell physiology by  $\text{Ca}^{2+}$  peaks are not known but with these new tools, different shapes of  $\text{Ca}^{2+}$  peaks can be produced. This  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation presents the great advantage that it can be instantaneously switched on and off which is not possible with chemical agents. It is now possible to micromanipulate cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations on demand by electrical manipulation and to activate or not SOCCs and VOCCs. This approach can help to understand the implication of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in biologic processes as in differentiation and to determine the important parameters of the  $\text{Ca}^{2+}$  peaks for cell physiology (frequency, amplitude, shape, etc).

## Acknowledgements

This work was supported by CNRS, IGR, Université Paris XI and the ANR (Intcell-ANR-10-BLAN-916, IPSIOAT-ANR-11-BS09-0031 and Memove-ANR-11-BS01-006) and was also conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA).

Authors would like to thank Dr Bassim Al Sakere for the haMSCs, Dr Brigitte Attal-Trétout, Nelly Dorval and Thomas Schmid for the development of the exposure device and their general help, Dr Philippe Leveque for the lending of the FID generator and the tap-off, and Delong Zhou for his contribution to the Cell Profiler program.

## References

1. Lee, RH et al., Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* **14**, 311 (2004).
2. Lindroos, B, Suuronen, R, and Miettinen, S, The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev* **7**, 269 (2011).
3. Dominici, M et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315 (2006).
4. Deslex, S et al., Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* **11**, 19 (1987).
5. Zuk, PA et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211 (2001).
6. Zuk, PA et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279 (2002).
7. Hauner, H et al., Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* **84**, 1663 (1989).
8. Sen, A et al., Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* **81**, 312 (2001).
9. Reinisch, A et al., Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med* **2**, 371 (2007).

10. Hudson, JE et al., A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells Dev* **20**, 77 (2011).
11. Bonab, MM et al., Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *Bmc Cell Biol* **7** (2006).
12. Gimble, J and Guilak, F, Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* **5**, 362 (2003).
13. Halvorsen, YD et al., Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* **7**, 729 (2001).
14. Halvorsen, YC, Wilkison, WO, and Gimble, JM, Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4**, S41 (2000).
15. Wall, ME, Bernacki, SH, and Lobo, EG, Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering* **13**, 1291 (2007).
16. Kawano, S et al., Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **32**, 165 (2002).
17. Sun, S, Liu, Y, Lipsky, S, and Cho, M, Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *FASEB J* **21**, 1472 (2007).
18. Golzio, M et al., [Calcium and electroporabilized cells]. *J Soc Biol* **197**, 301 (2003).
19. Poddevin, B, Orlowski, S, Belehradek, J, Jr., and Mir, LM, Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem Pharmacol* **42 Suppl**, S67 (1991).
20. Andre, FM and Mir, LM, Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects. *Curr Gene Ther* **10**, 267 (2010).
21. Schwan, HP, Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv Biol Med Phys* **5**, 147 (1957).
22. Vernier, PT et al., Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochemical and biophysical research communications* **310**, 286 (2003).
23. Frandsen, SK et al., Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Res* **72**, 1336 (2012).
24. Guilak, F et al., Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* **206**, 229 (2006).
25. Liew A, AF, Lesueur LL, De Ménorval MA, O'Brien T, Mir LM, Robust, efficient and practical electroporation transfer method for human Mesenchymal Stem Cells using square electric pulses. *Human Gene Therapy Methods in press* (2013).
26. Dalmay, C et al., A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells. *Lab Chip* **12**, 4709 (2012).
27. Resende, RR et al., Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 246 (2010).
28. Joshi, RP et al., Simulations of intracellular calcium release dynamics in response to a high-intensity, ultrashort electric pulse. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **75**, 041920 (2007).
29. Silve, A, Leray, I, and Mir, LM, Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10ns electric pulse. *Bioelectrochemistry* (2011).
30. Vernier, PT, Sun, Y, and Gundersen, MA, Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *Bmc Cell Biol* **7**, 37 (2006).
31. Tieleman, DP, The molecular basis of electroporation. *BMC Biochem* **5**, 10 (2004).
32. Vernier, PT and Ziegler, MJ, Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers. *J Phys Chem B* **111**, 12993 (2007).

33. Breton, M et al.,Transport of siRNA through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: an experimental and computational study. *J Am Chem Soc* **134**, 13938 (2012).
34. Mauroy, C et al.,Giant lipid vesicles under electric field pulses assessed by non invasive imaging. *Bioelectrochemistry* **87**, 253 (2012).
35. Semenov, I, Xiao, S, and Pakhomov, AG,Primary pathways of intracellular Ca(2+) mobilization by nanosecond pulsed electric field. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 981 (2013).
36. de Menorval, MA, Mir, LM, Fernandez, ML, and Reigada, R,Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. *PLoS One* **7**, e41733 (2012).

## Figures

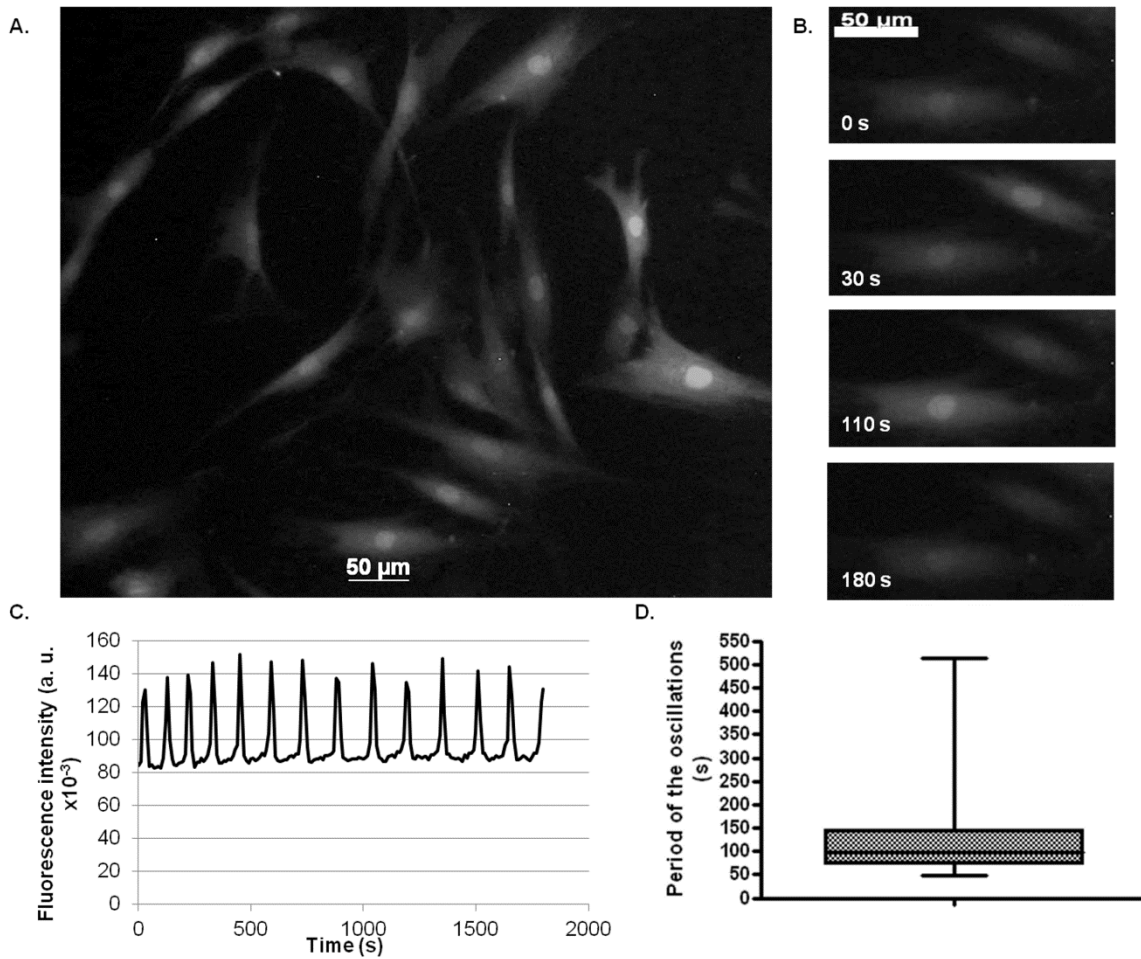


Figure 1: Attached haMSCs, preloaded with Fluo-4 (5 $\mu\text{M}$ ), presenting spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in complete DMEM. a, Snapshot in epifluorescence of Fluo-4 labeled haMSCs. b, Focus on two Fluo-4 labeled cells at different times of observation. The cells are presenting asynchronous spontaneous oscillations. Pictures have been taken with objective 10x. c,  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations of one haMSC extracted from a movie of 30min (one image every 10 s). The  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations seem to have controlled amplitude and rythm. d, Distribution of the oscillation periods of oscillating haMSCs. 56 cells were followed. 98% exhibited oscillations. 80% exhibited oscillations all along the observation (and were plotted). There was intercellular variability but the average time between two oscillations was 144 s and the median time was 99 s.

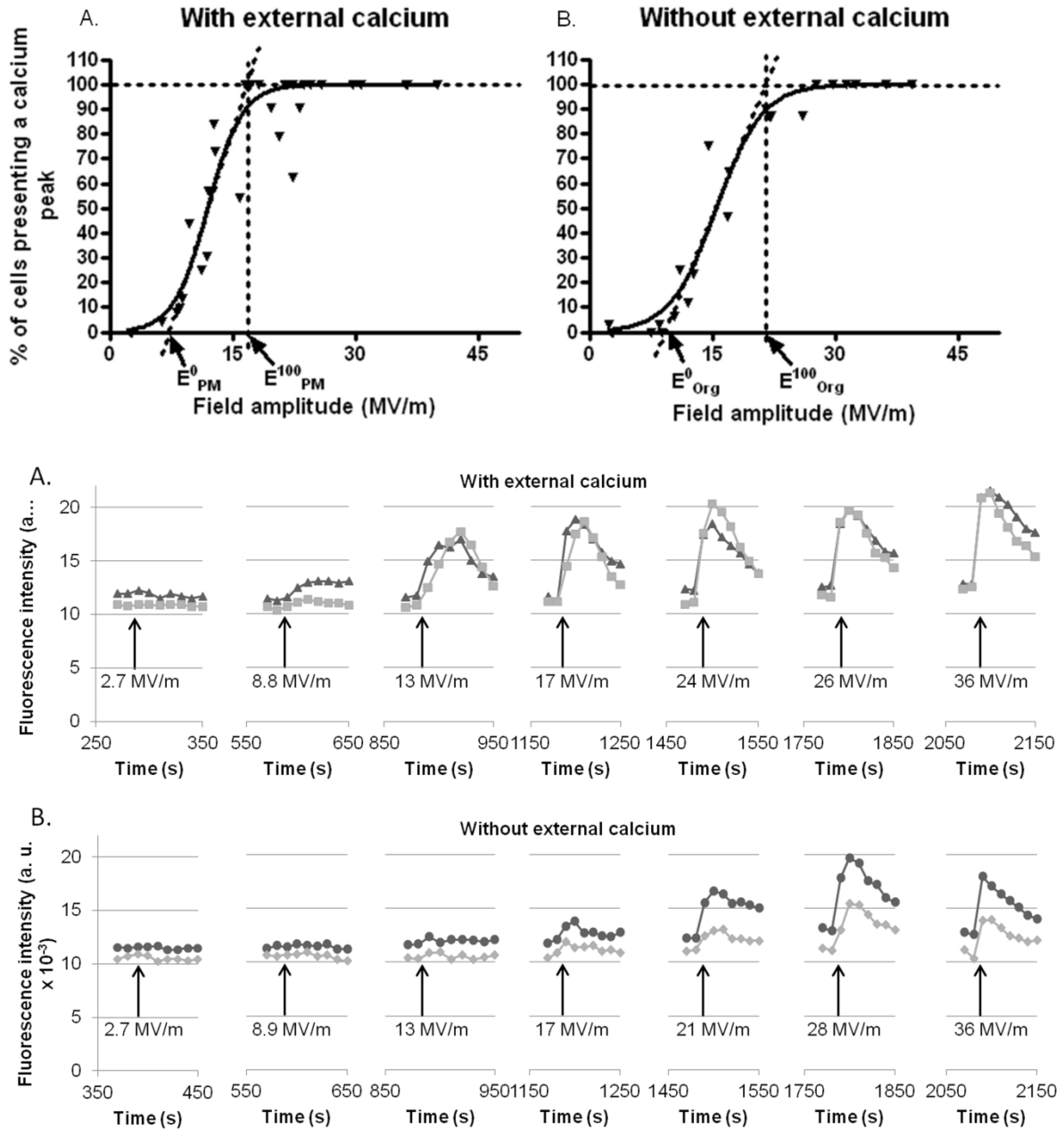


Figure 2: Effect of the amplitude of the electric field on the percentage of cells presenting a  $\text{Ca}^{2+}$  response and on the shape of the  $\text{Ca}^{2+}$  peaks in the presence or in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ . a and b, Field amplitudes needed to start to permeabilize the attached haMSCs ( $E^0$ ) and for the permeabilization of all the attached haMSCs ( $E^{100}$ ) in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (a) or in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (b).  $n=5$  for experiments with external calcium and  $n=4$  in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . 17 to 30 cells were observed for each tested electric fields. Lower electric field was needed to induce  $\text{Ca}^{2+}$  peaks in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  than in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

c and d, Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  peaks recorded in two adherent haMSCs responding to several nsPEF ranging from  $2.7 \text{ MV.m}^{-1}$  to  $36 \text{ MV.m}^{-1}$ . c. 2 cells  $\text{Ca}^{2+}$  profiles from the same experiment done in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (complete DMEM). d. 2 cells  $\text{Ca}^{2+}$  profiles



from the same experiment done in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (S-MEM). The shape of the beginning of the  $\text{Ca}^{2+}$  peaks was depending on the electric field.

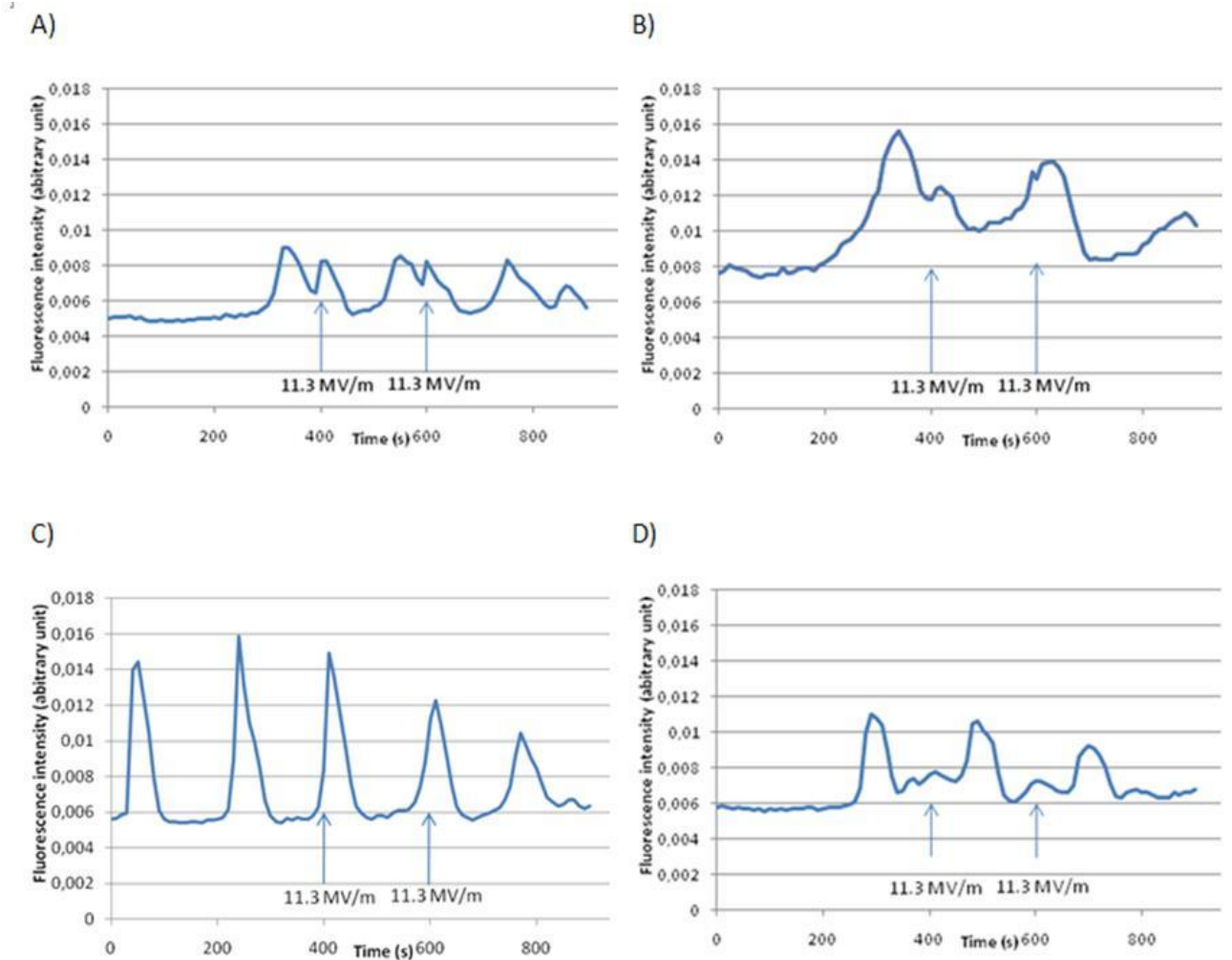


Figure 3: Attached haMSCs cells presenting spontaneous and induced  $\text{Ca}^{2+}$  peaks in complete DMEM. A single 10 ns nsPEF was applied twice (at 400 s and 600 s of the video). a, b and c, NsPEFs applied during spontaneous peaks. If the nsPEF is delivered simultaneously with the decreasing part of a spontaneous oscillation, the cell can exhibit a electrically induced  $\text{Ca}^{2+}$  peak. There was no electrically induced  $\text{Ca}^{2+}$  peak if the nsPEF was delivered during the rising part of the spontaneous oscillation. d, NsPEFs applied between two spontaneous oscillations. The cell presented a small induced  $\text{Ca}^{2+}$  peak. In all the cases the application of nsPEFs did not stop the spontaneous oscillations.

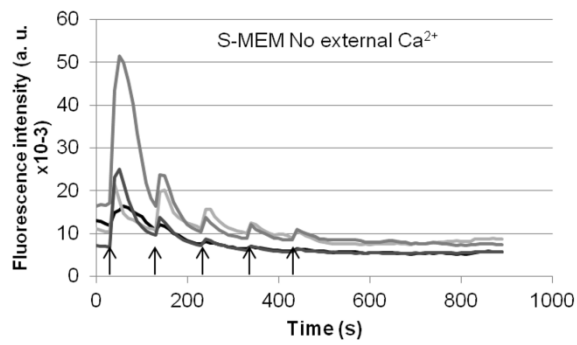


Figure 4: HaMSCs in suspension (laid down on the bottom of the channel of the exposure device) presenting  $\text{Ca}^{2+}$  peaks induced by nsPEFs. Cells were pulsed in S-MEM. nsPEFs were delivered every 100s. The 3 first arrows correspond to a 10 ns pulse of 20 MV/m. The last 2 arrows correspond to a 10 ns pulse of 24 MV/m. Each nsPEF induced a  $\text{Ca}^{2+}$  peak but the amplitudes decreased.

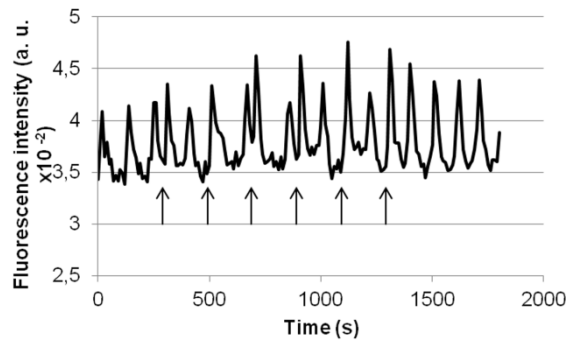


Figure 5: Attached haMSC presenting  $\text{Ca}^{2+}$  peaks induced by 100  $\mu\text{s}$  micropulses of 31 kV/m (arrows) 6 times (interval : 200 s) in complete DMEM medium. There is no loss of the spontaneous oscillations and the electrically induced  $\text{Ca}^{2+}$  peaks had the same duration and amplitude as the spontaneous oscillations.

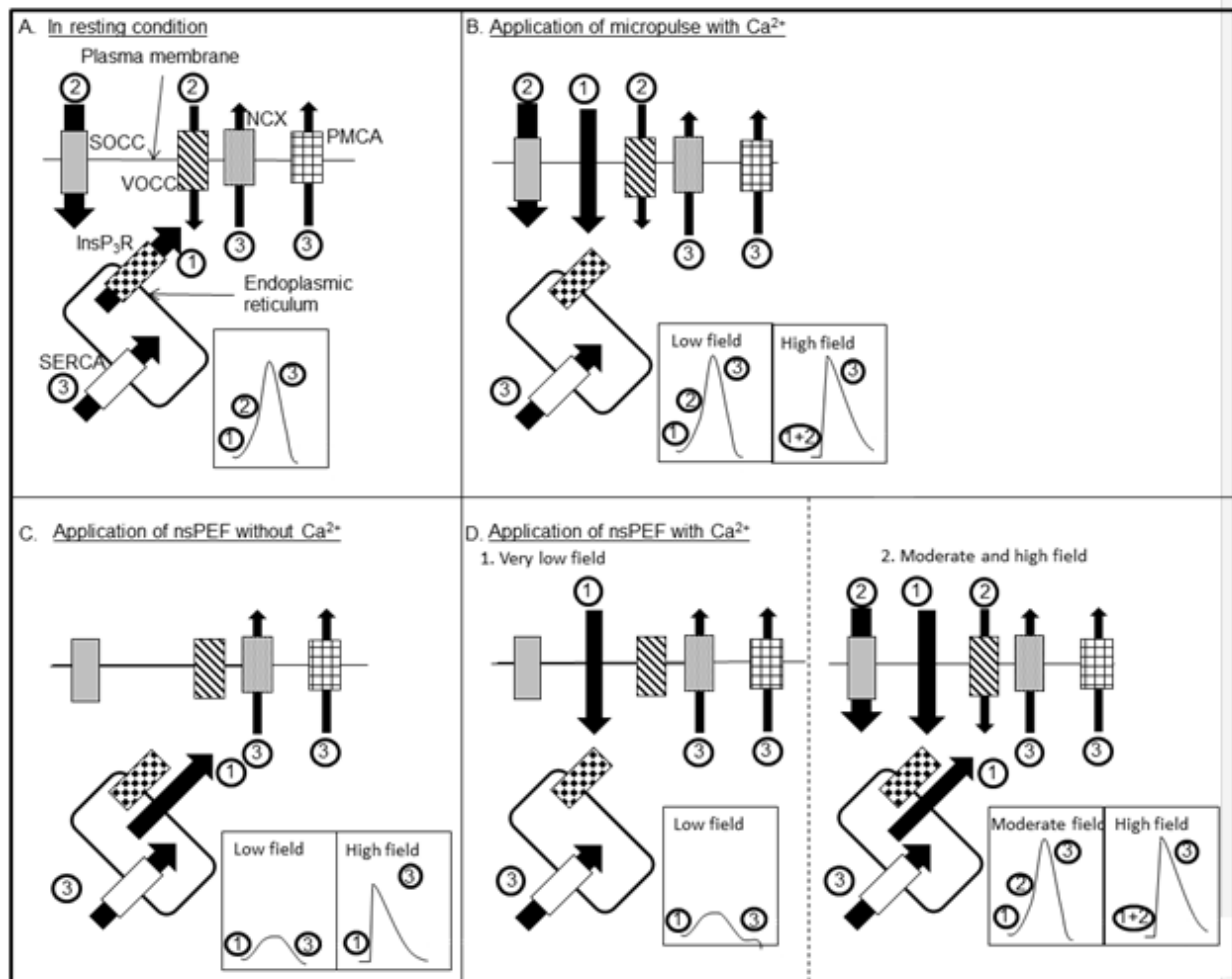


Figure 6: Summary scheme of the Ca<sup>2+</sup> flows observed in haMSCs. a, Spontaneous oscillations according to the Kawano hypothesis. b, Ca<sup>2+</sup> peak triggered by nsPEF in the presence of Ca<sup>2+</sup>. When low electric field was applied (from 15 to 25 kV/m) the shape of the induced Ca<sup>2+</sup> peaks was the same as the one of the spontaneous oscillations. When higher electric field was applied, the amplitude and the duration were the same as the ones of spontaneous oscillations but the shape of the beginning of the peak was sharper than the one of spontaneous oscillations. With  $\mu$ sPEFs only the external Ca<sup>2+</sup> was involved. c, Ca<sup>2+</sup> peak triggered by nsPEF in the absence of Ca<sup>2+</sup>. The higher the electric field, the higher the amplitude of the induced Ca<sup>2+</sup> peak. d, Ca<sup>2+</sup> peak triggered by nsPEFs in the presence of Ca<sup>2+</sup>. At low electric field, only the external Ca<sup>2+</sup> was involved. At moderate and high electric field, external Ca<sup>2+</sup> and ER stored Ca<sup>2+</sup> were involved. Black arrows represent Ca<sup>2+</sup> flows.

## Supplementary data

Table 1 : Percentages of cells presenting  $\text{Ca}^{2+}$  peaks and percentages of responding cells showing a gradual increase in the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at the beginning of the peak in response to low electric fields  $\mu\text{sPEF}$ . The higher the electric field, the higher the percentage of cells presenting an induced  $\text{Ca}^{2+}$  peak and the lower the percentage of responding cell showing a gradual increase at the beginning of the peak.

Electric field	Number of exposed cells	% of responding cells	% of the responding cells showing a gradual increase in the $\text{Ca}^{2+}$ concentration
15 MV/m	216	42%	33%
20 MV/m	216	84%	25%
25 MV/m	142	96%	22.5%



## **Discussion/Conclusions**



Les différentes expériences menées au cours de cette thèse ont permis :

1. de détailler l'action du DMSO dans une membrane lipidique comportant 20% de cholestérol (% molaire) à l'échelle moléculaire grâce à la vérification expérimentale des prédictions des simulations de dynamique moléculaires,
2. de permettre une comparaison moléculaire entre la perméabilisation par un agent chimique (le DMSO) et un agent physique (les impulsions électriques),
3. de développer un dispositif d'exposition aux impulsions électriques nanosecondes permettant d'appliquer des impulsions de 10 ns et d'amplitude de champ allant jusqu'à 40 MV.m<sup>-1</sup> et d'observer en temps réel, par microscopie, l'effet de ces impulsions sur les cellules,
4. de générer des pics calciques cytosoliques chez des cellules d'une lignée cellulaire non excitable (les cellules DC-3F),
5. d'évaluer les champs électriques nécessaires pour perméabiliser la membrane plasmique d'une part et les membranes des réservoirs calciques intracellulaires (principalement le réticulum endoplasmique) d'autre part,
6. de développer trois protocoles différents permettant de micromanipuler les concentrations calciques cytosoliques des cellules souches mésenchymateuses et de reproduire artificiellement des oscillations calciques spontanées de ces cellules. Il est donc possible de générer soit seulement une entrée de Ca<sup>2+</sup> extérieur dans le cytoplasme (en utilisant des impulsions microseconde en présence de Ca<sup>2+</sup>), soit une entrée simultanée de Ca<sup>2+</sup> extérieur et un relargage du Ca<sup>2+</sup> stocké dans le réticulum endoplasmique (en utilisant des impulsions nanoseconde en présence de Ca<sup>2+</sup>) ou pour finir seulement un relargage du Ca<sup>2+</sup> interne stocké dans le réticulum endoplasmique (en utilisant des impulsions nanoseconde en l'absence de Ca<sup>2+</sup> extérieur).

## **I. Comparaison entre méthode chimique/méthode physique de perméabilisation des membranes cellulaires**

Les résultats présentés dans cette thèse permettent de comparer la méthode chimique de perméabilisation des cellules par le DMSO avec la méthode physique de perméabilisation par l'application d'impulsions électriques.



## **A. Ressemblance des structures de perméabilisation**

D'après la dynamique moléculaire, le DMSO ainsi que l'application d'un champ électrique génèrent la mise en place de pores hydrophiles. Les résultats de ces simulations semblent être confirmés par l'expérimentation (Cf. article 1 de cette thèse pour la perméabilisation par le DMSO et l'article de Breton *et al.* de 2012<sup>71</sup> pour la perméabilisation par les impulsions électriques).

Lors de la perméabilisation par le DMSO, il y a une première étape qui précède la perméabilisation membranaire et qui n'est pas retrouvée avec la perméabilisation par les champs électriques. En effet, le DMSO s'insère dans la membrane sous les têtes des phospholipides ce qui a pour conséquence d'affiner la membrane plasmique et d'augmenter sa surface.

L'étape suivante de la perméabilisation par le DMSO est similaire à la première étape de l'électroperméabilisation. Dans les deux cas il y a création de pores membranaires. Ces pores sont formés par une première molécule d'eau qui s'insère dans la partie hydrophobe de la membrane et qui entraîne d'autres molécules d'eau dans cet espace hydrophobe. Il peut y avoir des créations de début de colonnes d'eau des deux côtés de la membrane dans les deux types de perméabilisation car ces phénomènes sont stochastiques. En effet, l'application de l'agent perméabilisant augmente la possibilité d'apparition de ces colonnes d'eau indépendamment du feuillet observé.

Lorsque la colonne d'eau ou les deux demi-colonnes d'eau se faisant face grandissent jusqu'à traverser toute l'épaisseur de la membrane cela permet de mettre en contact les deux compartiments aqueux. Suite à cela, il y a stabilisation de la colonne d'eau par les phospholipides qui se disposent à l'interface entre l'eau et les chaînes aliphatiques des phospholipides par diffusion latérale.

De plus, il a été montré que ces deux types d'agents perméabilisants ont des effets fusogènes. Cet effet fusogène est dû à l'effet du DMSO et des impulsions électriques sur l'eau située à l'interface entre la solution aqueuse des milieux intérieurs et extérieurs et la bicouche lipidique. Cette eau interfaciale génère une répulsion qui empêche le contact des membranes des cellules voisines. Lorsque les cellules sont soumises à l'effet du DMSO ou des impulsions électriques cette eau interfaciale est affectée et le contact entre les membranes des cellules est favorisé. L'utilisation du DMSO a comme avantage d'affecter toute la surface de la membrane cellulaire alors que l'électrofusion affecte surtout les pôles de la cellule faisant face aux électrodes. De plus, il est plus facile de contrôler la concentration d'un produit chimique que de mesurer les champs électriques ainsi que leur homogénéité. Cependant, l'électrofusion est plus facile à mettre en œuvre et à contrôler car la gamme de travail entre l'apparition de l'effet fusogène et celle de la toxicité est plus

grande. Cette toxicité importante du DMSO est peut-être liée au fait que toute la membrane cellulaire est déstabilisée alors que l'effet est plus localisé lors de l'électrofusion. De plus, l'effet fusogène est plus rapide avec l'électrofusion. C'est donc pour ces différentes raisons qu'actuellement l'électrofusion est plus utilisée que la fusion médiée par le DMSO.

Pour finir, Melkonyan *et al.* montré que l'action combinée du DMSO et des impulsions électriques peut permettre d'augmenter l'efficacité de transfection par rapport à l'électroporéabilisation seule<sup>380</sup>. Les résultats de Melkonyan *et al.* et de l'article 1 de cette thèse laissent penser qu'il peut y avoir un effet additif entre la perméabilisation par le DMSO et l'électroporéabilisation.

## **B. Notion de fin de la perturbation**

L'avantage des techniques physiques par rapport aux techniques chimiques employées pour perméabiliser les membranes repose sur le fait qu'il est possible de retirer complètement l'agent physique après l'exposition. En effet, le potentiel transmembranaire revient à la valeur du potentiel de repos en quelques  $\mu$ s après la fin de l'application des impulsions électriques. Dans le cas des agents chimiques, même si les cellules sont lavées ou que la solution est diluée, il reste toujours des traces du produit chimique surtout dans le cas du DMSO puisqu'il s'insère dans la membrane. Il est possible qu'une partie du DMSO reste ancrée dans la membrane même après lavage ou dilution du produit. Il est donc pratiquement impossible de supprimer complètement l'agent perméabilisant.

Cette propriété permet une optimisation de l'exposition plus aisée et un meilleur contrôle de la toxicité dans le cas des impulsions électriques par rapport à l'utilisation du DMSO.

## **C. Différences de toxicité et d'efficacité entre la perméabilisation par le DMSO et celle par l'application d'un champ électrique**

Même si la perméabilisation chimique par le DMSO et la perméabilisation physique par les impulsions électriques semblent avoir des mécanismes moléculaires d'action très semblables, leur efficacité et leur toxicité sont différentes. En effet, il a été montré que différents types de molécules, dont la taille varie de quelques Da à quelques milliers de kDa, pouvaient traverser les pores formés dans le cas de l'électroporéabilisation (médicaments, marqueurs fluorescents, acides nucléiques). Les résultats de cette thèse montrent que dans le cas de la perméabilisation par le DMSO, les molécules d'eau traversent rapidement et en grande quantité la bicouche lipidique par l'intermédiaire des pores hydrophiles. Le  $\text{Ca}^{2+}$  emprunte aussi cette voie mais l'effet est visualisé plus tardivement. La perméabilisation à

ces deux molécules s'effectue dans le régime II du DMSO (pores hydrophiles mais maintien de la structure de la membrane) avec des concentrations en DMSO compatibles avec une bonne survie cellulaire. En effet, les entrées d'eau et de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule sont observées pour le régime II du DMSO (entre 15% et 20% de DMSO). Cependant l'entrée de molécule plus grosse, comme le Yo-Pro n'a lieu que pour le régime III du DMSO (déstabilisation intense de la membrane entraînant sa destruction). Il semble donc que la perméabilisation par cet agent chimique ne permette pas d'internaliser de grosses molécules comme de l'ADN, contrairement à la perméabilisation électrique. Il peut y avoir plusieurs hypothèses expliquant cela :

1. les pores formés par le DMSO sont peut-être de plus petite taille que les électropores car même si ces derniers sont initiés par une seule colonne d'eau, ils peuvent s'élargir tant que la différence de tension est appliquée ce qui n'est peut-être pas le cas des pores formés grâce au DMSO,
2. l'absence de force électrophorétique dans le cas du DMSO ne permet peut-être pas de forcer des grosses molécules chargées à entrer dans la cellule,
3. l'effet du DMSO affectant toute la surface de la membrane, quand cet effet est suffisamment important pour perméabiliser la cellule à de grosses molécules il entraîne une forte mortalité cellulaire.

#### **D. Le DMSO n'entraîne pas, théoriquement, d'oxydation des lipides comme lors de l'électroperméabilisation**

La perméabilisation longue durée (jusqu'à 50 min) observée dans le cas de l'électroperméabilisation de cellules et reposant sur l'oxydation des lipides membranaires ne peut pas être impliquée dans les mécanismes de perméabilisation du DMSO. En effet, le DMSO ne peut pas avoir d'effets oxydants comme les impulsions électriques sur les phospholipides car il n'est pas responsable d'oxydations. De plus, le DMSO a même des effets antioxydants<sup>381</sup> ce qui confirme que la perméabilisation des membranes biologiques dues à l'oxydation des lipides ne peut pas avoir lieu avec le DMSO. Par ailleurs, il est envisageable d'observer une perméabilisation des membranes plasmiques après le lavage des cellules pour éliminer le DMSO si les molécules de DMSO restent ancrées dans la bicouche lipidique même s'il existe un fort gradient en DMSO entre la bicouche lipidique et le milieu extracellulaire. Cependant cette question n'a pas été étudiée et reste en suspens.

## **E. Notion de perméabilisation à une molécule donnée et importance du système utilisé pour déterminer la perméabilisation**

Au cours des expériences nécessaires à la publication de l'article 1 de cette thèse, des expériences utilisant l'iodure de propidium (IP) ont été réalisées dans un premier temps avant d'utiliser du Yo-Pro qui a la particularité d'être plus petit que l'IP (375 Da pour le Yo-Pro contre 541 Da pour l'IP). Ces deux molécules sont des marqueurs très utilisés pour démontrer la perméabilisation des cellules par la perméabilisation des cellules par les impulsions électriques. L'IP nécessitait des temps plus longs pour être internalisé que le Yo-Pro et il semblait que l'IP ne rentrait que lorsqu'il y avait une mort cellulaire. L'entrée du Yo-Pro a été visible plus précocement et dans des conditions où la viabilité cellulaire était moins affectée. Ces observations montrent donc que le choix du marqueur à utiliser est très important. Ici, il est possible que la taille du marqueur soit impliquée dans cette différence mais il est aussi possible que le nombre de molécules internalisées nécessaires pour obtenir un signal détectable en cytométrie en flux soit moins important pour le Yo-Pro que pour l'IP. Cette particularité ferait du Yo-Pro un marqueur de perméabilisation plus sensible que l'IP. De plus, l'entrée de l'eau et du  $\text{Ca}^{2+}$  a été observée pour des concentrations plus faibles de DMSO que l'entrée du Yo-Pro ce qui peut aussi être dû à la taille du marqueur utilisé et à la sensibilité de la méthode de détection.

Au regard de ces résultats, il est important de prendre en compte la technique de détection de la perméabilisation lors de comparaison de résultats expérimentaux et de comparer ce qui est comparable. Le choix d'une technique ou d'une autre peut donc être à l'origine d'une variabilité importante dans les seuils de perméabilisation observés entre différentes études. Ceci est montré par l'article de Bowman *et al.* (2010) qui montre que des impulsions de 600 ns et de 200 kV.m<sup>-1</sup> permettent d'observer une internalisation de l'ion  $\text{TI}^+$  sans que les ions propidium ou Yo-Pro ne soient internalisés<sup>58</sup>. Cependant, d'autres articles montrent que ces marqueurs peuvent être internalisés après l'application de nanopulses ayant d'autres caractéristiques électriques. En effet, Vernier *et al.* ont montré que le Yo-Pro pouvait être internalisé par l'application de 30 impulsions de 4 ns et de 6MV.m<sup>-1</sup> délivrées à 1kHz<sup>66</sup>. De plus, Müller *et al.* (2001) ont montré que l'IP pouvait être internalisé par l'application d'une impulsion de 10 ou de 100 ns et de 15 MV.m<sup>-1</sup>. Cela montre bien que les conditions nécessaires à la perméabilisation de la membrane plasmique à ces différentes molécules sont différentes et que les seuils de perméabilisation ne sont pas les mêmes pour des conditions électriques données.

## **II. Génération de pics calciques par l'application de différents types d'impulsions électriques**

Au cours de cette thèse, des pics calciques ont été générés sur différents modèles de cellules (cellules DC-3F et haMSC) en appliquant des impulsions microseconde et nanoseconde.

### **A. Importance du dispositif d'exposition**

L'application d'impulsions électriques microsecondes n'entraîne pas de contraintes importantes en ce qui concerne le dispositif d'exposition (dans l'article 3 de cette thèse, deux tiges parallèles d'acier inoxydable et espacées de 5 mm ont été simplement disposées au fond de puits de plaques 24 puits et utilisées pour délivrer les impulsions microsecondes). Dans le cas des impulsions nanoseconde, il existe des contraintes électriques bien plus importantes et le choix du dispositif d'exposition est primordial.

#### **1) Possibilité de travailler à des champs très élevés et de n'appliquer qu'une seule impulsion**

Le dispositif qui a été développé au cours de cette thèse a la particularité de pouvoir supporter des voltages élevés (jusqu'à 8 kV ont été délivrés sur le dispositif) sans aucune dégradation des composants électriques. De plus, la faible distance entre les électrodes (300  $\mu\text{m}$  et 150  $\mu\text{m}$ ) permet de générer un champ électrique très élevé, allant jusqu'à 40  $\text{MV.m}^{-1}$ , ce qui n'a jamais été décrit dans la littérature avant la réalisation de ce dispositif. De plus, il a fallu prévenir la création d'arcs électriques en isolant toutes les parties du dispositif où une petite couche d'air pourrait séparer des zones connectées respectivement au cœur et à la gaine des câbles coaxiaux.

L'intérêt de pouvoir travailler avec des impulsions nanoseconde avec des champs électriques très élevés est de pouvoir avoir des effets biologiques avec 1 seule impulsion et donc de s'affranchir du choix de la fréquence à utiliser quand plusieurs impulsions sont nécessaires pour observer un effet biologique sur les cellules. En effet, il a été démontré que lorsque des trains d'impulsions nanoseconde sont délivrés sur des cellules, le choix de la fréquence de travail est très important. En effet, des expériences conduites au sein du laboratoire par une collègue<sup>382</sup> ainsi que les travaux de Pakhomova *et al.* (2011)<sup>383</sup> montrent que l'efficacité de perméabilisation des impulsions électriques varie considérablement en fonction de la fréquence. Les fréquences inférieures à 1 Hz sont plus efficaces que les fréquences supérieures. De plus, en général, dans le domaine de la perméabilisation réversible ou irréversible par l'application d'impulsions électriques, on cherche à éviter les

phénomènes thermiques ; il faut aussi prendre ce paramètre en compte, surtout lorsque des hautes fréquences sont utilisées. Pour finir, l'application de hautes fréquences demande un suivi très fin des oscillations délivrées car il est possible que la tension chute au cours de la libération du train d'impulsions.

Ce dispositif a été conçu pour être utilisé sur un microscope à épifluorescence. D'une part, la biopuce a été élaborée sur un support en quartz et d'autre part, un support a été développé pour l'adapter à un microscope à la place de la platine utilisée classiquement. Il est donc possible de visualiser des effets biologiques importants avec l'application d'une seule impulsion nanoseconde et donc de s'affranchir de ces contraintes.

## 2) Intérêt de pouvoir travailler avec des cellules adhérentes ou attachées

Il a été montré que les cellules attachées et les cellules adhérentes et étalées n'avaient pas les mêmes seuils de perméabilisation <sup>144</sup>. Cette différence est due aux différences de géométrie des cellules lorsqu'elles sont sphériques ou étalées. L'utilisation de cuvettes d'électroporation permet de travailler avec un grand nombre de cellules en suspension mais pas avec des cellules adhérentes. Les électrodes à aiguilles peuvent être utilisées avec des cellules adhérentes ou des cellules en suspension mais ce type de dispositif d'électrodes ne peut être appliqué qu'à un très petit nombre de cellules et il pose le problème de l'homogénéité du champ appliqué.

Le microdispositif qui a été développé au cours de cette thèse a donc différents avantages. Pour commencer, il permet de travailler avec quelques dizaines à quelques centaines de cellules. De plus, il permet de travailler avec des cellules adhérentes ou en suspension. Pour finir, le champ électrique appliqué est homogène entre les électrodes dans les canaux lorsque la lamelle utilisée pour fermer les canaux est posée au contact des électrodes.

## 3) Importance de l'adaptation de l'impédance du système

L'un des objectifs du travail de développement de ce dispositif était de réaliser un dispositif adapté au circuit électrique. Pour cela, il fallait que l'impédance du système soit la plus proche possible de  $50\ \Omega$  en milieu conducteur (type S-MEM, MEM ou DMEM). L'équipe de l'ENS de Cachan a donc utilisé une géométrie permettant d'obtenir cette impédance lorsque le dispositif est fermé par une lamelle et que les canaux sont remplis avec du milieu de culture de conductivité de  $1,4\ \text{S.m}^{-1}$  (conductivité du S-MEM, du MEM ou du DMEM, par exemple). La longueur des électrodes est différente dans les deux modèles de biopuce (modèle à  $150\ \mu\text{m}$  entre les électrodes et modèle à  $300\ \mu\text{m}$ ) pour garder l'adaptation à  $50\ \Omega$ . Cette longueur est de  $3,5\ \text{cm}$  pour le modèle avec un espace inter-électrodes de  $150\ \mu\text{m}$  et de  $3\ \text{cm}$  pour l'autre modèle.

L'intérêt de travailler avec du matériel adapté électriquement est de permettre d'utiliser au mieux les capacités du générateur d'impulsions nanosecondes. En effet, si le dispositif a une impédance très différente des 50  $\Omega$ , une partie du signal est réfléchi et il est considéré que la partie réfléchi du signal n'a pas affecté les cellules. Dans le cas du microdispositif présenté ici, seulement 5% du signal est réfléchi, ce qui montre que le dispositif a donc une impédance très proche des 50  $\Omega$ .

## **B. Importance du type d'impulsion utilisée dans la génération de pics calciques**

Les articles 2 et 3 de cette thèse montrent que l'application d'une impulsion de 10 ns en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  permet de générer des pics calciques chez les cellules DC-3F et haMSC. De plus, les haMSC présentent des oscillations calciques spontanées qui sont liées à leur état de différenciation. Ces oscillations sont contrôlées par le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le réticulum endoplasmique par l'intermédiaire des canaux couplés à des  $\text{IP}_3\text{R}$ . L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est ensuite amplifiée par l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les SOCC (majoritairement) et les VOCC (en moindre proportion). Il est donc intéressant d'essayer de reproduire ces pics pour mieux comprendre l'implication de ces variations de la concentration calcique dans le contrôle de la différenciation cellulaire.

Il a déjà été montré dans la littérature que la forme des pics calciques générés par des impulsions nanosecondes en présence et en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  étaient différentes<sup>57</sup> car les mécanismes impliqués ne sont pas les mêmes. L'article 3 de cette thèse montre qu'il est possible d'utiliser les impulsions nanosecondes et les impulsions microsecondes pour reproduire les oscillations calciques des haMSC si les bons paramètres électriques sont utilisés.

La forme des pics calciques générés par l'application d'impulsions nanoseconde en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  chez les haMSC dépend de l'amplitude du champ électrique appliqué. En effet, des impulsions avec des champs électriques compris entre environ 8 et 11  $\text{MV.m}^{-1}$  induisent des pics calciques de faible amplitude alors que des impulsions de 11 à 13  $\text{MV.m}^{-1}$  entraînent des pics calciques de plus grande amplitude ressemblant fortement aux oscillations spontanées. Lorsque des champs électriques de plus de 17  $\text{MV.m}^{-1}$  sont appliqués, les pics calciques générés ont une forme différente : la base du pic présente une augmentation beaucoup plus brutale que les oscillations spontanées qui démarrent graduellement.

Il semble que le champ électrique nécessaire à générer un pic calcique diffère selon le type cellulaire. En effet, il a fallu utiliser une impulsion de 28  $\text{MV.m}^{-1}$  pour observer une

perméabilisation de toutes les cellules DC-3F situées dans le champ d'observation alors que pour les haMSC le champ nécessaire à perméabiliser 100% des cellules est plus faible (moins de  $20 \text{ MV.m}^{-1}$ ).

Lorsque ces impulsions nanoseconde sont délivrées en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , la base du pic induit présente une augmentation graduelle de la concentration calcique cytosolique pour des champs électriques compris entre  $13$  et  $21 \text{ MV.m}^{-1}$  et une augmentation plus brutale de la concentration calcique du cytoplasme pour des amplitudes de  $21 \text{ MV.m}^{-1}$  et plus. Ces pics sont dus à la perméabilisation des organites intracellulaires impliqués dans le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  (principalement le réticulum endoplasmique).

De plus, les pics induits en présence et en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et pour des champs électriques élevés (respectivement plus de  $17 \text{ MV.m}^{-1}$  avec  $\text{Ca}^{2+}$  et plus de  $21 \text{ MV.m}^{-1}$  sans  $\text{Ca}^{2+}$  extérieur) sont asymétriques car la pente correspondant à l'augmentation de la concentration calcique est plus forte que celle correspondant au retour à la ligne de base. Cependant, en termes de durée et d'amplitude, ces pics calciques induits par une impulsion nanoseconde en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  sont comparables aux oscillations spontanées.

Le troisième type de stimulation repose sur l'application d'une impulsion de  $100 \mu\text{s}$  et de quelques dizaines de  $\text{kV.m}^{-1}$  en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cela a pour conséquence de générer des pics calciques dont l'amplitude et la durée sont aussi très proches des oscillations calciques spontanées. Cependant, comme pour les impulsions nanoseconde, la forme de la base du pic dépend de l'amplitude du champ électrique appliqué. Pour des amplitudes de  $15$  à  $25 \text{ kV.m}^{-1}$  une partie des cellules présentent des pics avec, à la base, une augmentation graduelle de la concentration calcique cytosolique comparable à la forme des oscillations spontanées. Pour une amplitude supérieure ( $31 \text{ kV.m}^{-1}$ ) la forme de la base des pics est différente puisque la concentration calcique cytosolique augmente de manière brutale. En l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extérieur, aucun pic calcique n'est généré par l'application d'une impulsions microseconde ce qui prouve que ces impulsions génèrent des pics calciques par l'intermédiaire d'une perméabilisation de la membrane plasmique et qu'elles n'affectent pas les organites internes.

Il est donc possible de générer des pics calciques de différentes formes en utilisant ces trois protocoles pour étudier quel est le paramètre important de ces oscillations (forme de la base, forme générale, amplitude, durée) qui pourrait être impliqué dans la relation établie entre les oscillations spontanées et l'état de différenciation des haMSC. Les impulsions nanoseconde permettent de perméabiliser la membrane plasmique ainsi que la membrane du réticulum alors que les impulsions microseconde ne perméabilisent que la membrane plasmique. Il est possible d'envisager que les impulsions nanoseconde en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  entraînent la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique ainsi que l'afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu



extracellulaire, ce qui se rapproche plus du mécanisme des oscillations spontanées que les autres techniques qui ne font appel qu'à un seul type de flux calcique.

### **C. Perméabilisation de la membrane plasmique pour des champs électriques inférieurs à ceux nécessaires à la perméabilisation des organites**

Au début des années 2000, les premiers travaux sur les impulsions nanoseconde ont émis l'hypothèse que ces impulsions électriques ne perméabilisaient que la membrane des organites sans affecter la membrane plasmique car la durée de ces impulsions était inférieure au temps de charge de la membrane plasmique<sup>384, 385, 386</sup>. En 2003, Vernier *et al.* ont montré que ces impulsions affectaient aussi la membrane plasmique en générant l'externalisation des phosphatidylsérines<sup>56</sup>. Dans les années qui ont suivi, plusieurs publications ont montré que les impulsions nanoseconde perméabilisaient la membrane plasmique à des petites molécules et à des molécules de taille moyenne<sup>66, 69, 137, 288, 387</sup>. De plus, des articles très récents ont montré que les conditions permettant de perméabiliser les membranes des organites permettaient aussi de perméabiliser la membrane plasmique<sup>57, 310</sup>. L'article 3 de cette thèse montre qu'il est possible de perméabiliser la membrane plasmique ainsi que les organites responsables du stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  (principalement le réticulum endoplasmique) en utilisant une seule impulsion de 10 ns et de l'ordre de grandeur de la dizaine de  $\text{MV.m}^{-1}$ . Ces résultats suggèrent que le champ électrique à utiliser pour perméabiliser la membrane plasmique est plus faible que celui nécessaire à la perméabilisation des structures internes de la cellule. Ce résultat est cohérent avec les résultats de Semenov *et al.* (2013) qui ont aussi utilisé le  $\text{Ca}^{2+}$  comme marqueur de la perméabilisation du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique par des impulsions nanoseconde. La comparaison des seuils de perméabilisation est réalisable dans ces deux études car la molécule suivie pour déterminer la perméabilisation des différents types de membrane est la même (le  $\text{Ca}^{2+}$ ) et la méthode de détection est aussi la même (marqueur fluorescents du  $\text{Ca}^{2+}$  observé par microscopie).

Cependant, les seuils de perméabilisation observés dans l'étude de Semenov *et al.* sont plus faibles (autour de  $0,9 \text{ MV.m}^{-1}$  en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $1,9 \text{ MV.m}^{-1}$  en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que ceux présentés dans cette thèse ( $7,5 \text{ MV.m}^{-1}$  en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $9,5 \text{ MV.m}^{-1}$  en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Deux explications peuvent être données. La première est que les impulsions utilisées dans l'article de Semenov *et al.* sont plus longues (60 ns) que celles présentées dans l'article 3 de cette thèse (10 ns). La deuxième explication est que les cellules utilisées sont différentes. Lorsque les cellules haMSC sont attachées au substrat elles ont une géométrie très aplatie et très étalée, ce qui est différent de la géométrie des

CHO qui sont plus compactes et la géométrie des cellules est un paramètre essentiel dans la détermination des seuils de perméabilisation (Cf. II. C. 3) b) ii).

Dans l'étude de l'équipe de P.T. Vernier (2012) le Yo-Pro a été utilisé comme marqueur de perméabilisation de la membrane plasmique<sup>310</sup> et d'autres marqueurs ont été utilisés pour suivre la perméabilisation de la mitochondrie (la rhodamine 123, l'éthyle ester de tétraméthyle rhodamine et la calcéine dont la fluorescence est éteinte par le Cobalt). Cet article montre que l'application de cinq impulsions nanosecondes (ou plus) de 4 ns et de 10 MV/m<sup>-1</sup> permettaient la perméabilisation de la mitochondrie et de la membrane plasmique.

## **I. Perspectives**

Il serait intéressant d'étudier le mécanisme de perméabilisation du DMSO encore plus en détail pour pousser la comparaison avec les impulsions électriques encore plus loin. Nous savons maintenant que la perméabilisation de la membrane utilise des mécanismes très proches et il était déjà connu que ces deux agents perméabilisants ont des effets fusogènes. Qu'en est-il de la perméabilisation des membranes des organites par le DMSO ou de l'externalisation des PtdSer par le DMSO ? Le DMSO étant une petite molécule, il est possible qu'après la perméabilisation de la membrane plasmique par le DMSO, cette molécule puisse entrer et affecter les membranes des organites. Cependant, il faudrait qu'il y ait suffisamment de molécules internalisées pour que cela se produise.

Il pourrait être possible de combiner ces deux agents perméabilisants pour optimiser les résultats de perméabilisation. De plus, la confrontation des résultats de dynamique moléculaire avec des résultats expérimentaux *in vitro* faite dans l'article 1 de cette thèse ou dans l'article de Breton *et al*<sup>71</sup>, par exemple, ont permis de valider les prédictions de la DM. Ces résultats laissent envisager que la DM pourrait devenir un outil puissant dans les années à venir pour expliquer différents mécanismes biologiques à l'échelle moléculaire.

La génération de pic calciques induits par des impulsions nanoseconde ou des impulsions microseconde permet de micromanipuler les concentrations cytosolique du Ca<sup>2+</sup> et des organites stockant cet ion comme le réticulum endoplasmique. Le Ca<sup>2+</sup> étant impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire (différenciation cellulaire, prolifération, apoptose, fécondation, ...) cet outil pourrait avoir de nombreuses applications futures. En ce qui concerne les haMSC, il serait intéressant d'utiliser ces méthodes pour mieux comprendre les interactions entre les oscillations calciques spontanées et la différenciation de ces cellules souches adultes.



## **Matériel et méthodes**



## **I. Cellules et conditions de culture**

### **A. DC-3F**

Les DC-3F, des fibroblastes de poumon de hamster chinois <sup>388</sup> ont été cultivés dans du milieu MEM (milieu essentiel minimum ou Minimal Essential Medium en anglais) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les solutions de culture cellulaire ont été achetées chez Life Technologies (Cergy-Pontoise, France) et le DMSO a été acheté chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> et passées tous les deux ou trois jours avec respectivement une dilution au 1/10<sup>e</sup> ou au 1/20<sup>e</sup>.

### **B. HaMSC**

Les haMSC, des cellules souches mésenchymales humaines issues du tissu adipeux, ont été isolées à partir de lipo-aspirats de patients ayant donné leur consentement éclairé pour l'utilisation de ces cellules <sup>389</sup>. Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco ou Dulbecco's Modified Eagle Medium en anglais) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les solutions de culture cellulaire ont été achetées chez Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> et passées tous les trois ou quatre jours avec une dilution au 1/2. La multipotence de ces cellules a été évaluée en analysant différents marqueurs de surface caractéristiques des hMSC (CD34, CD44, CD45, CD90, CD105) et en soumettant les cellules à des conditions de différenciation en adipocytes et en ostéoblastes <sup>389</sup>.

## **II. Microscopie**

### **A. Observation morphologique et mesure de la taille des cellules DC-3F exposées au DMSO**

L'observation de la morphologie des DC-3F en présence de différentes concentrations de DMSO a été faite avec un microscope confocal Leica TCS SPE avec un objectif ACS APO 63x, 1,30 NA à immersion et le logiciel LAS AF version 2.4 (Leica, Allemagne).

Pour la mesure de la taille des cellules, les images des DC-3F ont été prises avec un microscope inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert S100 associé au logiciel Axio Vision version 4.6 et équipé avec une caméra Zeiss AxioCam Hrc (Carl Zeiss, Allemagne). Le

diamètre au temps T ( $D_T$ ) de la même cellule a été mesuré après 3 (D3 min), 10, 18, 26 et 33 min d'incubation dans le DMSO. Le ratio  $D_T/D3$  min est reporté.

Une image a été prise toutes les minutes entre 3 min et 33 min après la début de l'exposition aux différentes concentrations de DMSO.

## **B. Observation des pics calciques induits par les impulsions nanosecondes sur les DC-3F**

Les cellules DC-3F ont été cultivées sur des lamelles de verre de 170  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pendant au moins 4h pour qu'elles adhèrent et s'étalent. Pour observer les effets des impulsions nanoseconde sur les cellules DC-3F les lamelles de verre ont été incubées 30 min en présence de 5  $\mu\text{M}$  d'un marqueur de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent, le Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ , Life Technologies) à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de  $\text{CO}_2$ . Les lamelles ont été rincées trois fois avec du PBS (phosphate buffered saline) puis elles ont été placées au-dessus de la puce (le côté où les cellules ont été cultivées situé à l'intérieur du canal).

Les images ont été prises avec un microscope inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert S100 associé au logiciel Axio Vision version 4.6 et équipé avec une caméra Zeiss AxioCam Hrc (Carl Zeiss, Allemagne).

## **C. Observation des pics calciques induits par les impulsions nanosecondes sur les haMSC**

Les cellules haMSC ont été cultivées sur des lamelles de verre de 170  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pendant au moins 24h pour qu'elles adhèrent et s'étalent. Pour observer les effets des impulsions nanoseconde sur les cellules haMSC les lamelles de verre ont été incubées 30 min en présence de 5  $\mu\text{M}$  d'un marqueur de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent, le Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ , Life Technologies) ainsi qu'en présence de 375 nM d'un marqueur nucléaire fluorescent permettant de localiser facilement les noyaux cellulaires, le Hoechst 33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$ , Life Technologies) à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de  $\text{CO}_2$ . En effet, ces cellules ont très étalées et moins repérables que les DC-3F en contraste de phase. De plus l'utilisation d'un marqueur nucléaire permet l'utilisation d'un logiciel informatique effectuant le détourage systématique des noyaux cellulaires. Les lamelles ont été rincées trois fois avec du PBS puis elles ont été placées au-dessus de la biopuce (le côté où les cellules ont été cultivées situé à l'intérieur du canal).

Il n'y a pas de superpositions entre les fluorescences du Fluo-4 et du Hoechst 33342 car leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont suffisamment éloignées.

Pendant les expériences, deux milieux de culture ont été utilisés : du DMEM et du S-MEM (milieu essentiel minimum pour culture en suspension ou suspension minimal essential medium en anglais). Le DMEM contient du  $\text{Ca}^{2+}$  alors que le S-MEM n'en contient pas.

Les images ont été prises avec un microscope inversé à épifluorescence Zeiss Axiovert S100 associé au logiciel Axio Vision version 4.6 et équipé avec une caméra Zeiss AxioCam Hrc (Carl Zeiss, Allemagne). Une image a été prise toutes les 10 secondes pour chaque canal pendant 15 à 40 minutes. Le temps minimal pendant lequel la lampe reste allumée est d'environ 500 ms mais pour minimiser l'illumination des cellules, un filtre de densité filtrant 90% de l'intensité lumineuse (NE10B, Thorlabs, France) a été utilisé.

Le marqueur nucléaire Hoechst 33342 a été utilisé pour suivre la position des cellules pendant la vidéomicroscopie. En fait, les noyaux ont été reconnus et suivis en utilisant le logiciel CellProfiler (Broad Institute, Cambridge, USA) qui permet la mesure automatique de l'intensité du signal de fluorescence sur chaque cellule de chaque image.

### **III. Cytométrie en flux**

Quel que soit le marqueur de perméabilisation utilisé, les cellules DC-3F ont été incubées sous agitation constante grâce à un agitateur horizontal de plaques après l'ajout de DMSO pour empêcher leur attachement à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de  $\text{CO}_2$ . Pour chaque expérience  $10^4$  cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux C6 Accuri (USA) à différents temps allant de 15 min à 3 h.

Toutes les expériences ont été réalisées 3 fois et les résultats présentés sont des moyennes des différentes valeurs  $\pm$  la déviation standard.

#### **A. Perméabilisation au $\text{Ca}^{2+}$ des cellules DC-3F en présence de DMSO**

Des cellules DC-3F adhérentes ont été incubées pendant 30 min en présence de 5  $\mu\text{M}$  de Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ , Life Technologies) à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de  $\text{CO}_2$ . Après l'incubation, les cellules ont été rincées 3 fois au PBS. Puis les cellules ont été détachées du support de culture en utilisant une solution de Tryple Express (Life Technologies), centrifugées et re-suspendues dans du MEM contenant du DMSO entre 0% et 40% vol/vol (les ratios molaires entre le DMSO et l'eau correspondants allant de 0% à 14,5% mol/mol).



## **B. Perméabilisation au Yo-Pro des cellules DC-3F en présence de DMSO**

Les cellules DC-3F adhérentes ont été détachées du support de culture en utilisant une solution de Tryple Express (Life Technologies), centrifugées et resuspendues dans du MEM contenant 5  $\mu$ M de Yo-Pro-1 ( $\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$ , Life Technologies), utilisé comme un marqueur de perméabilisation membranaire, et du DMSO à différentes concentrations entre 0% et 40% vol/vol (les ratios molaires entre le DMSO et l'eau correspondants allant de 0% à 14,5% mol/mol).

## **IV. Montages électriques**

### **A. Montage électrique du générateur à impulsions nanoseconde et mesure des impulsions**

Un générateur commercial FID (FID, GmbH, Modèle FGP 10-ISM10, Burbach, Allemagne) gracieusement prêté par le Dr P. Leveque, XLIM, Limoges, dans le cadre des projets ANR NanopulseBioChip et IntCell. Ce générateur a une impédance de sortie de 50  $\Omega$  et a été utilisé pour exposer les cellules DC-3F et haMSC aux impulsions nanosecondes. Ce générateur délivre des impulsions monopolaires trapézoïdales avec une durée de 10 ns à la moitié de la hauteur de l'impulsion<sup>69, 390, 391</sup>. Ce générateur délivre une tension d'amplitude comprise entre 3 kV et 10 kV et les impulsions formées ont des fronts de montée compris entre 0,4 et 0,6 ns. Les fronts de descente ont une durée comprise entre 1 et 1,5 ns.

Dans le but de caractériser le signal incident ainsi que le signal réfléchi réellement appliqués aux cellules, un extracteur (245 NMFFP-100, Barth Electronics Technology, USA) a été connecté entre le générateur et le dispositif d'exposition en utilisant deux lignes de transmission<sup>392</sup>. L'extracteur est un dispositif comportant trois ports. L'impédance de la ligne principale (*i.e.* la ligne reliant le générateur au dispositif d'exposition) est de 50  $\Omega$  alors que l'impédance du port permettant la mesure de l'impulsion (*i.e.* la ligne reliant l'extracteur à l'oscilloscope) est de 4950  $\Omega$  permettant la mesure des impulsions délivrés à l'échantillon avec un ratio 1 :100. Plusieurs atténuateurs coaxiaux (Radiall, Rosny Sous Bois, France) ont été utilisés entre l'extracteur et l'oscilloscope pour avoir une atténuation de 43 dB. Un oscilloscope Wavemaster 808 Zi 8 GHz (LeCroy, Courtaboeuf, France) a été utilisé pour les mesures.

## **B. Montage électrique du générateur à impulsions microseconde**

Des impulsions électriques trapézoïdales de 100  $\mu$ s ont été générées en utilisant un Cliniporator<sup>TM</sup> (IGEA, Carpi, Italie). Le générateur a été connecté à deux électrodes composées de tiges parallèles d'acier inoxydable de 1 mm de diamètre et séparées par 4 mm. Ces tiges ont été pliées parce que ces électrodes ont été construites pour entrer dans des puits de plaques 24 puits. Le système entier a été placé sous le microscope pour acquérir les images.

## **V. Système d'exposition aux impulsions nanoseconde**

Le dispositif d'exposition correspond à une biopuce en quartz de 2 pouces et d'épaisseur de 500  $\mu$ m (ACM, France) sur laquelle des électrodes en or parallèles et séparées de 150 ou 300  $\mu$ m (selon les modèles) ont été déposées par électro-dépôt. Ces électrodes sont longues d'environ 3 cm et ont une hauteur de 25  $\mu$ m. Autour de ces électrodes, un motif de SU8 de 100  $\mu$ m d'épaisseur a été dessiné pour définir l'emplacement de la lamelle de verre ainsi que pour permettre l'écoulement du liquide utilisé pour remplir les canaux.



## **Bibliographie**



1. R. Hooke, *Micrographia : or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*. (J. Martyn and J. Allestry, Londres, ed., 1665), pp. 246, p. 113.
2. M. J. Schleiden, *Beiträge zur Phytogenesis*. (ed., 1838), pp. 40, p.
3. T. Schwann, *Mikroskopische Untersuchungen Über Die Übereinstimmung in Der Struktur und Dem Wachstum Der Tiere und Pflanzen*. (BoD – Books on Demand, ed., 1839), pp. 294, p.
4. R. Virchow, Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. *Virchows Archiv* **8**, 3 (1855).
5. C. E. Overton, *Ueber die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzelle*. (Fäsi & Beer, ed., 1895), pp. 201, p.
6. C. E. Overton, *Studien über die Narkose*. (Fisher, ed., 1901), pp. 195, p.
7. E. Gorter, F. Grendel, On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of experimental medicine* **41**, 439 (Mar 31, 1925).
8. J. F. Danielli, H. davson, A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**, 495 (1935).
9. N. A. Campbell, J. B. Reece, R. Mathieu, *Biologie*. (De Boeck, ed., 2004), pp. 1364, p. 145-149.
10. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*. (ASM Press, ed., 2007), pp. 820, p. 60.
11. J. M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochimie*. (Flammarion Médecine-Sciences, ed., 2008), pp. 1026, p. 329-374.
12. B. Alberts, *Biologie moléculaire de la cellule*. (Flammarion Médecine-Sciences, ed., 2004), pp. 1463, p. 585-660.
13. H. Lodish et al., *Biologie moléculaire de la cellule*. (De Boeck Supérieur, ed., 2005), pp. 1096, p. 149-156.
14. O. G. Mouritsen, *Life - As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*. (Springer, ed., 2005), pp. 276, p. 45.
15. K. Simons, J. L. Sampaio, Membrane Organization and Lipid Rafts. *Csh Perspect Biol* **3**, (Oct, 2011).
16. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*. (ASM Press, ed., 2007), pp. 820, p. 61.
17. L. Le Guyader, Utilisation de sondes pyréniques *in vivo* pour caractériser l'état de phase global de la membrane plasmique de cellules eucaryotes., Toulouse III-Paul Sabatier (2007).
18. M. R. Vist, J. H. Davis, Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29**, 451 (Jan 16, 1990).
19. C. R. Woese, G. E. Fox, Phylogenetic Structure of Prokaryotic Domain - Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5088 (1977).
20. S. V. Albers, B. H. Meyer, The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol* **9**, 414 (Jun, 2011).
21. L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **37**, 205 (Apr, 1951).
22. G. Karp, J. Bouharmont, P. L. Masson, *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments*. (De Boeck Supérieur, ed., 2010), pp. 840, p. 139.
23. L. D. Frye, M. Edidin, The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* **7**, 319 (Sep, 1970).
24. O. Sandre, L. Moreaux, F. Brochard-Wyart, Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10591 (Sep 14, 1999).
25. N. A. Campbell, J. B. Reece, R. Mathieu, *Biologie*. (De Boeck, ed., 2004), pp. 1364, p. 213-215.
26. D. V. Voet, J.G., *Biochimie*. (De Boeck Supérieur, ed., 2005), pp. 1600, p. 674.
27. B. Alberts, *Biologie moléculaire de la cellule*. (Flammarion Médecine-Sciences, ed., 2004), pp. 1463, p. 842.
28. G. M. Cooper, *La cellule : Une approche moléculaire*. (De Boeck Supérieur, ed., 1999), pp. 706, p. 534.
29. N. A. Campbell, J. B. Reece, R. Mathieu, *Biologie*. (De Boeck, ed., 2004), pp. 1364, p. 137.
30. B. Alberts et al., *Biologie moléculaire de la cellule*. (Flammarion Médecine-Sciences, ed., 2011), pp. 1601, p. 635.
31. S. D. Kohlwein, G. Daum, R. Schneiter, F. Paltauf, Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic - the yeast approach. *Trends in cell biology* **6**, 260 (Jul, 1996).
32. E. Zinser et al., Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **173**, 2026 (Mar, 1991).
33. G. Daum, Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **822**, 1 (Jun 12, 1985).

34. B. Gaigg, R. Simbeni, C. Hrastnik, F. Paltauf, G. Daum, Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1234**, 214 (Mar 22, 1995).
35. G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Bio* **9**, 112 (Feb, 2008).
36. Q. P. Chen, Q. T. Li, Effect of cardiolipin on proton permeability of phospholipid liposomes: the role of hydration at the lipid-water interface. *Archives of biochemistry and biophysics* **389**, 201 (May 15, 2001).
37. B. Alberts *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*. (Flammarion Médecine-Sciences, ed., 2011), pp. 1601, p. 754-787.
38. S. D. Conner, S. L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37 (Mar 6, 2003).
39. J. Mercer, A. Helenius, Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology* **11**, 510 (May, 2009).
40. O. Steele-Mortimer, L. A. Knodler, B. B. Finlay, Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic* **1**, 107 (Feb, 2000).
41. T. F. Roth, K. R. Porter, Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *The Journal of cell biology* **20**, 313 (Feb, 1964).
42. E. C. Beattie *et al.*, Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature neuroscience* **3**, 1291 (Dec, 2000).
43. S. A. Mousavi, L. Malerod, T. Berg, R. Kjekens, Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical journal* **377**, 1 (Jan 1, 2004).
44. H. Lodish *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*. (De Boeck Supérieur, ed., 2005), pp. 1096, p. 708-719.
45. J. Heuser, Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *The Journal of cell biology* **84**, 560 (Mar, 1980).
46. S. Matveev, X. Li, W. Everson, E. J. Smart, The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Advanced drug delivery reviews* **49**, 237 (Jul 28, 2001).
47. A. Kierszenbaum, *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. (De Boeck Supérieur, ed., 2006), pp. 619, p. 196.
48. R. H. G. Garrett, C.M., *Biochimie*. (De Boeck Supérieur, ed., 2000), pp. 1292, p. 537.
49. G. van Meer, K. Simons, Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* **36**, 51 (Jan, 1988).
50. T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons, Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *The Journal of cell biology* **141**, 929 (May 18, 1998).
51. L. D. Zajchowski, S. M. Robbins, Lipid rafts and little caves - Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *European Journal of Biochemistry* **269**, 737 (Feb, 2002).
52. O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, S. Xiao, A. G. Pakhomov, Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 792 (Mar, 2011).
53. M. A. de Menorval, L. M. Mir, M. L. Fernandez, R. Reigada, Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. *PloS one* **7**, e41733 (2012).
54. Y. Okada, Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics* **41**, 233 (2004).
55. K. Kinosita, Jr., T. Y. Tsong, Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* **268**, 438 (Aug 4, 1977).
56. P. T. Vernier *et al.*, Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochemical and biophysical research communications* **310**, 286 (Oct 17, 2003).
57. I. Semenov, S. Xiao, A. G. Pakhomov, Primary pathways of intracellular Ca(2+) mobilization by nanosecond pulsed electric field. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 981 (Mar, 2013).
58. A. M. Bowman, O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, A. G. Pakhomov, Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of Tl(+) uptake. *The Journal of membrane biology* **236**, 15 (Jul, 2010).
59. B. Poddevin, S. Orlowski, J. Belehradek, Jr., L. M. Mir, Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochemical pharmacology* **42 Suppl**, S67 (Dec 11, 1991).
60. G. Pucihar, L. M. Mir, D. Miklavcic, The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporated cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry* **57**, 167 (Sep, 2002).
61. M. R. Prausnitz *et al.*, Millisecond measurement of transport during and after an electroporation pulse. *Biophysical journal* **68**, 1864 (May, 1995).
62. P. J. Canatella, J. F. Karr, J. A. Petros, M. R. Prausnitz, Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. *Biophysical journal* **80**, 755 (Feb, 2001).

63. T. Kotnik, A. Macek-Lebar, D. Miklavcic, L. M. Mir, Evaluation of cell membrane electroporation by means of a nonpermeant cytotoxic agent. *BioTechniques* **28**, 921 (May, 2000).
64. C. Faurie, M. Golzio, P. Moller, J. Teissie, M. P. Rols, Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer. *DNA and cell biology* **22**, 777 (Dec, 2003).
65. K. J. Muller, V. L. Sukhorukov, U. Zimmermann, Reversible electroporation of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration. *The Journal of membrane biology* **184**, 161 (Nov 15, 2001).
66. P. T. Vernier, Y. Sun, M. A. Gundersen, Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *Bmc Cell Biol* **7**, 37 (2006).
67. G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, J. Teissie, Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporated cells. *Biophysical journal* **95**, 2837 (Sep 15, 2008).
68. S. Orlowski, J. Belehradek, Jr., C. Paoletti, L. M. Mir, Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochemical pharmacology* **37**, 4727 (Dec 15, 1988).
69. A. Silve, I. Leray, L. M. Mir, Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10 ns electric pulse. *Bioelectrochemistry* **87**, 260 (Oct, 2012).
70. M. P. Rols, J. Teissie, Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporation. *Biochim Biophys Acta* **1111**, 45 (Oct 19, 1992).
71. M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir, M. Tarek, Transport of siRNA through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: an experimental and computational study. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 13938 (Aug 29, 2012).
72. E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal* **1**, 841 (1982).
73. L. M. Mir, M. F. Bureau, R. Rangara, B. Schwartz, D. Scherman, Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* **321**, 893 (Nov, 1998).
74. M. Bettan *et al.*, Efficient DNA electroporation into tumors. *Bioelectrochemistry* **52**, 83 (Sep, 2000).
75. L. Grossin *et al.*, Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 829 (May, 2003).
76. B. L. Ibe, S. Xiao, K. H. Schoenbach, M. R. Murphy, A. G. Pakhomov, Plasma membrane permeabilization by 60- and 600-ns electric pulses is determined by the absorbed dose. *Bioelectromagnetics* **30**, 92 (Feb, 2009).
77. L. H. Wegner, W. Frey, S. Schonwalder, A critical evaluation of whole cell patch clamp studies on electroporation using the voltage sensitive dye ANNINE-6. *Bioelectrochemistry* **92**, 42 (Aug, 2013).
78. P. Kramar, A. M. Lebar, D. Miklavcic, Planar lipid bilayers: observing pore creation and extinction. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference* **2011**, 746 (2011).
79. A. Ivorra, B. Al-Sakere, B. Rubinsky, L. M. Mir, In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome. *Physics in medicine and biology* **54**, 5949 (Oct 7, 2009).
80. M. Pavlin *et al.*, Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension. *Biophysical journal* **88**, 4378 (Jun, 2005).
81. Y. Okada, J. Tadokoro, The Distribution of Cell Fusion Capacity among Several Cell Strains or Cells Caused by Hvj. *Exp Cell Res* **32**, 417 (Dec, 1963).
82. E. E. Schneeberger, H. Harris, An ultrastructural study of inter-specific cell fusion induced by inactivated Sendai virus. *J Cell Sci* **1**, 401 (Dec, 1966).
83. J. Anne, J. F. Peberdy, Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Archives of microbiology* **105**, 201 (Nov 7, 1975).
84. G. Pontecorvo, Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic cell genetics* **1**, 397 (Oct, 1975).
85. M. J. Bibb, J. M. Ward, D. A. Hopwood, Transformation of Plasmid DNA into *Streptomyces* at High-Frequency. *Nature* **274**, 398 (1978).
86. S. Chang, S. N. Cohen, High-Frequency Transformation of *Bacillus-Subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Mol Gen Genet* **168**, 111 (1979).
87. I. Brigger *et al.*, Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **303**, 928 (Dec, 2002).



88. J. Cha *et al.*, Gene transfection efficacy assessment of human cervical cancer cells using dual-mode fluorescence microendoscopy. *Biomed Opt Express* **4**, 151 (Jan 1, 2013).
89. Q. F. Ahkong, J. P. Desmazes, D. Georgescauld, J. A. Lucy, Movements of Fluorescent-Probes in the Mechanism of Cell-Fusion Induced by Poly(Ethylene Glycol). *J Cell Sci* **88**, 389 (Oct, 1987).
90. K. O. Evans, B. R. Lentz, Kinetics of lipid rearrangements during poly(ethylene glycol)-mediated fusion of highly curved unilamellar vesicles. *Biochemistry* **41**, 1241 (Jan 29, 2002).
91. S. A. Shah, Comparison of DMSO and glycerol as cryoprotectants for ascites tumor cells. *Experientia* **39**, 327 (Mar 15, 1983).
92. J. I. Spector, J. A. Yarmala, L. D. Marchionni, C. P. Emerson, C. R. Valeri, Viability and function of platelets frozen at 2 to 3 C per minute with 4 or 5 per cent DMSO and stored at -80 C for 8 months. *Transfusion* **17**, 8 (Jan-Feb, 1977).
93. E. R. Siebzehnuebl *et al.*, Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Human reproduction* **4**, 312 (Apr, 1989).
94. A. Farshad, B. Khalili, P. Fazeli, The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. *Pakistan journal of biological sciences: PJBs* **12**, 239 (Feb 1, 2009).
95. H. Lehn-Jensen, T. Greve, Preservation of bovine blastocysts in liquid nitrogen using two different freezing/thawing rates and DMSO/glycerol as cryoprotectants. *Theriogenology* **13**, 100 (Jan, 1980).
96. B. Bouyssou, D. Chupin, Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or glycerol. *Theriogenology* **17**, 159 (Feb, 1982).
97. C. M. Campero, Use of DMSO for the cryopreservation of *Tritrichomonas foetus* in liquid nitrogen. *Veterinary parasitology* **31**, 339 (Jun, 1989).
98. F. G. Offerijns, H. F. ter Welle, The effect of freezing, of supercooling and of DMSO on the function of mitochondria and on the contractility of the rat heart. *Cryobiology* **11**, 152 (Apr, 1974).
99. H. G. Hempling, S. White, Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* **21**, 133 (Apr, 1984).
100. M. F. Coldman, T. Kalinovsky, B. J. Poulsen, The in vitro penetration of fluocinonide through human skin from different volumes of DMSO. *The British journal of dermatology* **85**, 457 (Nov, 1971).
101. A. M. Kligman, Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide. 1. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **193**, 796 (Sep 6, 1965).
102. M. S. Evans, K. H. Reid, J. B. Sharp, Jr., Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neuroscience letters* **150**, 145 (Feb 19, 1993).
103. L. Sibert, A. Khalaf, H. Bugel, M. Sfafi, P. Grise, Intravesical dimethyl sulfoxide instillations can be useful in the symptomatic treatment of profuse hematuria due to eosinophilic cystitis. *The Journal of urology* **164**, 446 (Aug, 2000).
104. K. Marren, Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs. *The Physician and sportsmedicine* **39**, 75 (Sep, 2011).
105. E. N. Fossum, M. J. Lisowski, T. A. Macey, S. L. Ingram, M. M. Morgan, Microinjection of the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) into the periaqueductal gray modulates morphine antinociception. *Brain research* **1204**, 53 (Apr 14, 2008).
106. R. V. Panganamala, H. M. Sharma, R. E. Heikkila, J. C. Geer, D. G. Cornwell, Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **11**, 599 (Apr, 1976).
107. Q. F. Ahkong, D. Fisher, W. Tampion, J. A. Lucy, Mechanisms of cell fusion. *Nature* **253**, 194 (Jan 17, 1975).
108. S. Tristram-Nagle, T. Moore, H. I. Petrache, J. F. Nagle, DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study. *Biochim Biophys Acta* **1369**, 19 (Feb 2, 1998).
109. Z. W. Yu, P. J. Quinn, The effect of dimethyl sulphoxide on the structure and phase behaviour of palmitoleoylphosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* **1509**, 440 (Dec 20, 2000).
110. A. A. Gurtovenko, J. Anwar, Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 10453 (Sep 6, 2007).
111. A. K. Sum, J. J. de Pablo, Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophysical journal* **85**, 3636 (Dec, 2003).
112. A. A. Gurtovenko, J. Anwar, Ion transport through chemically induced pores in protein-free phospholipid membranes. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 13379 (Nov 29, 2007).

113. R. Notman, M. Noro, B. O'Malley, J. Anwar, Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 13982 (Nov 1, 2006).
114. M. Duvshani-Eshet, M. Machluf, Therapeutic ultrasound optimization for gene delivery: a key factor achieving nuclear DNA localization. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **108**, 513 (Nov 28, 2005).
115. M. Fechheimer *et al.*, Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8463 (Dec, 1987).
116. E. C. Unger, E. Hersh, M. Vannan, T. McCreery, Gene delivery using ultrasound contrast agents. *Echocardiography* **18**, 355 (May, 2001).
117. T. Li, K. Tachibana, M. Kuroki, M. Kuroki, Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice--initial results. *Radiology* **229**, 423 (Nov, 2003).
118. K. Kaddur, P. Palanchon, F. Tranquart, C. Pichon, A. Bouakaz, [Sonopermeabilization: therapeutic alternative with ultrasound and microbubbles]. *Journal de radiologie* **88**, 1777 (Nov, 2007).
119. M. Tamosiunas *et al.*, Microbubble Sonodestruction Rate as a Metric to Evaluate Sonoporation Efficiency. *J Ultras Med* **31**, 1993 (Dec, 2012).
120. A. J. Sale, W. A. Hamilton, Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim Biophys Acta* **163**, 37 (Aug, 1968).
121. C. B. Arena *et al.*, High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction. *Biomedical engineering online* **10**, 102 (2011).
122. B. Al-Sakere *et al.*, Tumor ablation with irreversible electroporation. *PLoS one* **2**, e1135 (2007).
123. S. Corovic, J. Bester, D. Miklavcic, An e-learning application on electrochemotherapy. *Biomedical engineering online* **8**, 26 (2009).
124. M. Golzio, J. Teissie, M. P. Rols, Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1292 (Feb 5, 2002).
125. M. P. Rols, D. Coulet, J. Teissie, Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *European journal of biochemistry / FEBS* **206**, 115 (May 15, 1992).
126. M. Coustets, N. Al-Karablieh, C. Thomsen, J. Teissie, Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae. *The Journal of membrane biology*, (Apr 11, 2013).
127. C. Mauroy *et al.*, Giant lipid vesicles under electric field pulses assessed by non invasive imaging. *Bioelectrochemistry* **87**, 253 (Oct, 2012).
128. L. M. Mir, H. Banoun, C. Paoletti, Introduction of Definite Amounts of Nonpermeant Molecules into Living Cells after Electroporation - Direct Access to the Cytosol. *Exp Cell Res* **175**, 15 (Mar, 1988).
129. O. Tounekti, G. Pron, J. Belehradek, L. M. Mir, Bleomycin, an Apoptosis-Mimetic Drug That Induces 2 Types of Cell-Death Depending on the Number of Molecules Internalized. *Cancer Res* **53**, 5462 (Nov 15, 1993).
130. J. Gehl *et al.*, In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta* **1428**, 233 (Aug 5, 1999).
131. S. Satkuskas *et al.*, Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **5**, 133 (Feb, 2002).
132. M. F. Bureau, J. Gehl, V. Deleuze, L. M. Mir, D. Scherman, Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim Biophys Acta* **1474**, 353 (May 1, 2000).
133. F. M. Andre *et al.*, Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Human gene therapy* **19**, 1261 (Nov, 2008).
134. M. Cemazar *et al.*, Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice. *Gene therapy* **16**, 635 (May, 2009).
135. P. Hojman *et al.*, Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Human gene therapy* **19**, 1249 (Nov, 2008).
136. W. Frey *et al.*, Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophysical journal* **90**, 3608 (May, 2006).
137. A. G. Pakhomov *et al.*, Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Archives of biochemistry and biophysics* **465**, 109 (Sep 1, 2007).

138. H. Pauly, H. P. Schwan, [Impedance of a suspension of ball-shaped particles with a shell; a model for the dielectric behavior of cell suspensions and protein solutions]. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil B: Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **14B**, 125 (Feb, 1959).
139. T. Kotnik, F. Bobanovic, D. Miklavcic, Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields - a theoretical analysis. *Bioelectroch Bioener* **43**, 285 (Aug, 1997).
140. H. P. Schwan, Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics* **5**, 147 (1957).
141. K. Kinoshita *et al.*, Electroporation of Cell-Membrane Visualized under a Pulsed-Laser Fluorescence Microscope. *Biophysical journal* **53**, 1015 (Jun, 1988).
142. T. Kotnik, G. Pucihar, D. Miklavcic, Induced Transmembrane Voltage and Its Correlation with Electroporation-Mediated Molecular Transport. *J Membrane Biol* **236**, 3 (Jul, 2010).
143. E. Neumann, K. Rosenheck, Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of membrane biology* **10**, 279 (Dec 29, 1972).
144. M. P. Rols, J. Teissie, Electroporation of Mammalian-Cells - Quantitative-Analysis of the Phenomenon. *Biophysical journal* **58**, 1089 (Nov, 1990).
145. J. M. Crowley, Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophysical journal* **13**, 711 (Jul, 1973).
146. D. S. Dimitrov, Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: a thin viscoelastic film model. *The Journal of membrane biology* **78**, 53 (1984).
147. I. G. Abidor *et al.*, Electric Breakdown of Bilayer Lipid-Membranes .1. Main Experimental Facts and Their Qualitative Discussion. *Bioelectroch Bioener* **6**, 37 (1979).
148. A. Golberg, M. Belkin, B. Rubinsky, Irreversible electroporation for microbial control of drugs in solution. *AAPS PharmSciTech* **10**, 881 (2009).
149. A. Polak *et al.*, On the Electroporation Thresholds of Lipid Bilayers: Molecular Dynamics Simulation Investigations. *The Journal of membrane biology*, (Jun 19, 2013).
150. H. G. L. Coster, U. Zimmermann, Mechanism of Electrical Breakdown in Membranes of Valonia-Utricularis. *J Membrane Biol* **22**, 73 (1975).
151. M. Hibino, H. Itoh, K. Kinoshita, Time Courses of Cell Electroporation as Revealed by Submicrosecond Imaging of Transmembrane Potential. *Biophysical journal* **64**, 1789 (Jun, 1993).
152. J. Teissie, T. Y. Tsong, Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry* **20**, 1548 (Mar 17, 1981).
153. J. Teissie, M. P. Rols, An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophysical journal* **65**, 409 (Jul, 1993).
154. L. H. Wegner *et al.*, A patch clamp study on the electro-permeabilization of higher plant cells: Supraphysiological voltages induce a high-conductance, K<sup>+</sup> selective state of the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 1728 (Jun, 2011).
155. I. P. Sugar, E. Neumann, Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation. *Biophysical chemistry* **19**, 211 (May, 1984).
156. S. A. Freeman, M. A. Wang, J. C. Weaver, Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation. *Biophysical journal* **67**, 42 (Jul, 1994).
157. D. C. Chang, T. S. Reese, Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophysical journal* **58**, 1 (Jul, 1990).
158. D. P. Tieleman, The molecular basis of electroporation. *BMC biochemistry* **5**, 10 (Jul 19, 2004).
159. M. Tarek, Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophysical journal* **88**, 4045 (Jun, 2005).
160. E. Tekle, M. D. Wolfe, H. Oubrahim, P. B. Chock, Phagocytic clearance of electric field induced 'apoptosis-mimetic' cells. *Biochemical and biophysical research communications* **376**, 256 (Nov 14, 2008).
161. P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 12993 (Nov 15, 2007).
162. Z. A. Levine, P. T. Vernier, Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *The Journal of membrane biology* **236**, 27 (Jul, 2010).
163. Z. A. Levine, P. T. Vernier, Calcium and phosphatidylserine inhibit lipid electropore formation and reduce pore lifetime. *The Journal of membrane biology* **245**, 599 (Oct, 2012).
164. M. Tokman *et al.*, Electric field-driven water dipoles: nanoscale architecture of electroporation. *PloS one* **8**, e61111 (2013).

165. I. P. Sugar, W. Forster, E. Neumann, Model of Cell Electrofusion - Membrane Electroporation, Pore Coalescence and Percolation. *Biophysical chemistry* **26**, 321 (May 9, 1987).
166. P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Y. H. Sun, M. A. Gundersen, D. P. Tieleman, Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers - in cells and in silico. *Phys Biol* **3**, 233 (Dec, 2006).
167. L. C. Benov, P. A. Antonov, S. R. Ribarov, Oxidative damage of the membrane lipids after electroporation. *General physiology and biophysics* **13**, 85 (Apr, 1994).
168. B. Gabriel, J. Teissie, Spatial compartmentation and time resolution of photooxidation of a cell membrane probe in electroporabilized Chinese hamster ovary cells. *European journal of biochemistry / FEBS* **228**, 710 (Mar 15, 1995).
169. P. Bonnafeous, M. Vernhes, J. Teissie, B. Gabriel, The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electroporabilization of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 123 (Nov 9, 1999).
170. P. T. Vernier *et al.*, Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. *PLoS one* **4**, e7966 (2009).
171. A. B. Silve, M; Leray, I; Mir, LM, in *Bioelectrics symposium*. (Kumamoto, Japan, 2012),
172. M. L. Escande-Geraud, M. P. Rols, M. A. Dupont, N. Gas, J. Teissie, Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporabilization in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* **939**, 247 (Apr 7, 1988).
173. R. Benz, U. Zimmermann, The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown. *Biochim Biophys Acta* **640**, 169 (Jan 8, 1981).
174. J. Teissie, M. P. Rols, Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporabilization. *Annals of the New York Academy of Sciences* **720**, 98 (May 31, 1994).
175. A. Lopez, M. P. Rols, J. Teissie, <sup>31</sup>P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporabilized Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* **27**, 1222 (Feb 23, 1988).
176. R. Shirakashi, V. L. Sukhorukov, I. Tanasawa, U. Zimmermann, Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes. *Int J Heat Mass Tran* **47**, 4517 (Oct, 2004).
177. A. T. Esser, K. C. Smith, T. R. Gowrishankar, Z. Vasilkoski, J. C. Weaver, Mechanisms for the Intracellular Manipulation of Organelles by Conventional Electroporation. *Biophysical journal* **98**, 2506 (Jun 2, 2010).
178. N. Skolucka *et al.*, ETM study of electroporation influence on cell morphology in human malignant melanoma and human primary gingival fibroblast cells. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* **1**, 94 (Apr, 2011).
179. R. C. Mulligan, B. H. Howard, P. Berg, Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome. *Nature* **277**, 108 (Jan 11, 1979).
180. J. Hillova, M. Hill, G. Goubin, D. Dantchev, Infectivity of Rous sarcoma cell DNA: comparison of two techniques of transfection assay. *Intervirology* **5**, 367 (1975).
181. E. G. Diacumakos, Methods for micromanipulation of human somatic cells in culture. *Methods in cell biology* **7**, 287 (1973).
182. H. Potter, L. Weir, P. Leder, Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 7161 (Nov, 1984).
183. A. V. Titomirov, S. Sukharev, E. Kistanova, In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* **1088**, 131 (Jan 17, 1991).
184. R. Heller *et al.*, In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS letters* **389**, 225 (Jul 8, 1996).
185. T. Suzuki, B. C. Shin, K. Fujikura, T. Matsuzaki, K. Takata, Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS letters* **425**, 436 (Apr 3, 1998).
186. H. Aihara, J. Miyazaki, Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature biotechnology* **16**, 867 (Sep, 1998).
187. M. P. Rols *et al.*, In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nature biotechnology* **16**, 168 (Feb, 1998).
188. S. Satkauskas *et al.*, Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer. *Human gene therapy* **16**, 1194 (Oct, 2005).
189. F. Yamoutpour *et al.*, Gene silencing for epidermal growth factor receptor variant III induces cell-specific cytotoxicity. *Molecular cancer therapeutics* **7**, 3586 (Nov, 2008).

190. T. Goto *et al.*, Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 354 (Jan 4, 2000).
191. C. L. Morton, P. M. Potter, Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **286**, 1066 (Aug, 1998).
192. M. Cemazar, T. Jarm, G. Sersa, Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Current gene therapy* **10**, 300 (Aug, 2010).
193. D. Pavlin, M. Cemazar, G. Sersa, N. Tozon, IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *Journal of translational medicine* **10**, 234 (2012).
194. A. Gothelf, P. Hojman, J. Gehl, Therapeutic levels of erythropoietin (EPO) achieved after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene therapy* **17**, 1077 (Sep, 2010).
195. E. Fattori *et al.*, Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *The journal of gene medicine* **7**, 228 (Feb, 2005).
196. T. E. Tjelle *et al.*, Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **9**, 328 (Mar, 2004).
197. M. Yamada *et al.*, Gene transfer of soluble transforming growth factor type II receptor by in vivo electroporation attenuates lung injury and fibrosis. *Journal of clinical pathology* **60**, 916 (Aug, 2007).
198. K. Birkholz *et al.*, Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood* **116**, 2277 (Sep 30, 2010).
199. A. Bonehill *et al.*, Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *Journal of immunology* **172**, 6649 (Jun 1, 2004).
200. F. Eriksson, T. Totterman, A. K. Maltais, P. Pisa, J. Yachnin, DNA vaccine coding for the rhesus prostate specific antigen delivered by intradermal electroporation in patients with relapsed prostate cancer. *Vaccine*, (Jul 2, 2013).
201. K. Kwak *et al.*, Multivalent human papillomavirus L1 DNA vaccination utilizing electroporation. *PloS one* **8**, e60507 (2013).
202. K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols* **2**, 3081 (2007).
203. J. Yu *et al.*, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917 (Dec 21, 2007).
204. M. Stadtfeld, K. Brennand, K. Hochedlinger, Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Current biology : CB* **18**, 890 (Jun 24, 2008).
205. S. Eminli, J. Utikal, K. Arnold, R. Jaenisch, K. Hochedlinger, Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem cells* **26**, 2467 (Oct, 2008).
206. D. Duinsbergen, M. Eriksson, P. A. t Hoen, J. Frisen, H. Mikkers, Induced pluripotency with endogenous and inducible genes. *Exp Cell Res* **314**, 3255 (Oct 15, 2008).
207. T. Aasen *et al.*, Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* **26**, 1276 (Nov, 2008).
208. L. Linta *et al.*, Rat embryonic fibroblasts improve reprogramming of human keratinocytes into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* **21**, 965 (Apr 10, 2012).
209. T. Brambrink *et al.*, Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell* **2**, 151 (Feb 7, 2008).
210. M. Stadtfeld, N. Maherali, D. T. Breault, K. Hochedlinger, Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell* **2**, 230 (Mar 6, 2008).
211. K. Kaji *et al.*, Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**, 771 (Apr 9, 2009).
212. M. C. Marchetto *et al.*, Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PloS one* **4**, e7076 (2009).
213. F. Gonzalez *et al.*, Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8918 (Jun 2, 2009).
214. J. Yu, K. F. Chau, M. A. Vodyanik, J. Jiang, Y. Jiang, Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PloS one* **6**, e17557 (2011).
215. K. Okita *et al.*, A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature methods* **8**, 409 (May, 2011).

216. Y. Takata *et al.*, Generation of iPS cells using a BacMam multigene expression system. *Cell structure and function* **36**, 209 (2011).
217. E. P. Papapetrou *et al.*, Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12759 (Aug 4, 2009).
218. M. Okino, H. Mohri, Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Japanese journal of cancer research : Gann* **78**, 1319 (Dec, 1987).
219. L. M. Mir, S. Orlowski, J. Belehradek, Jr., C. Paoletti, Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *European journal of cancer* **27**, 68 (1991).
220. J. Belehradek, Jr., S. Orlowski, B. Poddevin, C. Paoletti, L. M. Mir, Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *European journal of cancer* **27**, 73 (1991).
221. L. M. Mir *et al.*, [Potentiation of the antitumoral effect of electrochemotherapy by immunotherapy with allogeneic cells producing interleukin 2]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* **314**, 539 (1992).
222. L. M. Mir, S. Orlowski, B. Poddevin, J. Belehradek, Jr., Electrochemotherapy tumor treatment is improved by interleukin-2 stimulation of the host's defenses. *European cytokine network* **3**, 331 (May-Jun, 1992).
223. L. M. Mir *et al.*, [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* **313**, 613 (1991).
224. R. Heller *et al.*, Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* **77**, 964 (Mar 1, 1996).
225. G. Sersa, M. Cemazar, D. Miklavcic, Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res* **55**, 3450 (Aug 1, 1995).
226. G. Sersa *et al.*, Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *European journal of cancer* **34**, 1213 (Jul, 1998).
227. M. Cemazar, R. Milacic, D. Miklavcic, V. Dolzan, G. Sersa, Intratumoral cisplatin administration in electrochemotherapy: antitumor effectiveness, sequence dependence and platinum content. *Anti-cancer drugs* **9**, 525 (Jul, 1998).
228. G. Sersa, The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *Ejc Suppl* **4**, 52 (Nov, 2006).
229. M. Marty *et al.*, Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Ejc Suppl* **4**, 3 (Nov, 2006).
230. M. C. Whelan *et al.*, Effective treatment of an extensive recurrent breast cancer which was refractory to multimodal therapy by multiple applications of electrochemotherapy. *Ejc Suppl* **4**, 32 (Nov, 2006).
231. J. R. Garbay *et al.*, Successful repetitive treatments by electrochemotherapy of multiple unresectable Kaposi sarcoma nodules. *Ejc Suppl* **4**, 29 (Nov, 2006).
232. H. Umezawa, Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **5**, 1079 (1965).
233. H. Suzuki, K. Nagai, H. Yamaki, N. Tanaka, H. Umezawa, Mechanism of action of bleomycin. Studies with the growing culture of bacterial and tumor cells. *The Journal of antibiotics* **21**, 379 (Jun, 1968).
234. M. Takeuchi, T. Yamamoto, Effects of bleomycin on transplantable mouse tumors. *The Journal of antibiotics* **21**, 631 (Nov, 1968).
235. Y. Suzuki, H. Miyake, M. Sakai, Y. Inuyama, J. Matsukawa, Bleomycin in malignant tumors of head and neck. *The Keio journal of medicine* **18**, 153 (Sep, 1969).
236. L. M. Mir, O. Tounekti, S. Orlowski, Bleomycin: revival of an old drug. *General pharmacology* **27**, 745 (Jul, 1996).
237. J. Stubbe, J. W. Kozarich, Mechanisms of Bleomycin-Induced DNA-Degradation. *Chem Rev* **87**, 1107 (Oct, 1987).
238. A. D. D'Andrea, W. A. Haseltine, Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3608 (Aug, 1978).
239. L. F. Povirk, Y. H. Han, R. J. Steighner, Structure of Bleomycin-Induced DNA Double-Strand Breaks - Predominance of Blunt Ends and Single-Base 5' Extensions. *Biochemistry* **28**, 5808 (Jul 11, 1989).
240. L. F. Povirk, W. Wubter, W. Kohnlein, F. Hutchinson, DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic acids research* **4**, 3573 (Oct, 1977).

241. J. S. Lazo, J. C. Schisselbauer, G. M. Herring, K. A. Kennedy, Involvement of the cellular vacuolar system with the cytotoxicity of bleomycin-like agents. *Cancer communications* **2**, 81 (1990).
242. B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698 (Feb 13, 1965).
243. G. R. Pocock, C.D., *Physiologie humaine: les fondements de la médecine*. (Masson, ed., 2004), pp. 638, p. 35.
244. M. Jennerwein, P. A. Andrews, Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **23**, 178 (Feb, 1995).
245. D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard, Pt-195 Nmr Kinetic and Mechanistic Studies of Cis-Diamminedichloroplatinum and Trans-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society* **112**, 6860 (Sep 12, 1990).
246. N. P. Johnson, J. D. Hoeschele, R. O. Rahn, Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chemico-biological interactions* **30**, 151 (May, 1980).
247. B. Lund, H. H. Hansen, Chemotherapy in ovarian carcinoma. *Cancer surveys* **8**, 681 (1989).
248. F. Muggia, Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **112**, 275 (Jan, 2009).
249. J. P. Droz, M. Rivoire, Advanced testis cancer. *Current treatment options in oncology* **2**, 421 (Oct, 2001).
250. F. Calabro *et al.*, The contemporary role of chemotherapy for advanced testis cancer: a systematic review of the literature. *European urology* **61**, 1212 (Jun, 2012).
251. D. Raghavan *et al.*, Cytotoxic chemotherapy for advanced bladder cancer: cisplatin-containing regimens. *Seminars in oncology* **18**, 56 (Feb, 1991).
252. H. von der Maase, Gemcitabine and cisplatin in locally advanced and/or metastatic bladder cancer. *European journal of cancer* **36 Suppl 2**, 13 (Jul, 2000).
253. H. Sugimori, T. Iwasaka, K. Fukuda, Y. Hayashi, T. Hachisuga, Treatment of advanced cervical cancer by a combination of peplomycin, vincristine, mitomycin-C, and cisplatin. *Gynecologic oncology* **34**, 180 (Aug, 1989).
254. J. P. Geisler, J. Swathirajan, K. L. Wood, K. J. Manahan, Treatment of advanced or recurrent cervical cancer with Cisplatin or Cisplatin containing regimens: a cost effective analysis. *Journal of Cancer* **3**, 454 (2012).
255. G. Deppe, C. J. Cohen, H. W. Bruckner, Treatment of Advanced Endometrial Adenocarcinoma with Cis-Dichlorodiammine Platinum (II) after Intensive Prior Therapy. *Gynecologic oncology* **10**, 51 (1980).
256. O. Altundag, P. Dursun, A. Ayhan, Emerging drugs in endometrial cancers. *Expert Opin Emerg Dr* **15**, 557 (Dec, 2010).
257. F. J. Panettiere, L. Leichman, R. Obryan, C. Haas, W. Fletcher, Cis-Diamminedichloride Platinum(II), an Effective Agent in the Treatment of Epidermoid Carcinoma of the Esophagus - a Preliminary-Report of an Ongoing Southwest Oncology Group-Study. *Cancer Clin Trials* **4**, 29 (1981).
258. A. D. Wagner, U. Wedding, Advances in the Pharmacological Treatment of Gastro-Oesophageal Cancer. *Drug Aging* **26**, 627 (2009).
259. J. M. Bachaud *et al.*, [Concomitant association of radiotherapy and chemotherapy (CDDP 4-6 mg/m<sup>2</sup>/daily in continuous i.v. administration) in locally advanced ORL tumors]. *Bulletin du cancer* **81**, 212 (Mar, 1994).
260. H. Nakatani *et al.*, A totally implanted intra-arterial chemotherapy system for advanced maxillary sinus carcinoma. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* **71 Suppl 1**, 116 (2010).
261. L. G. Campana *et al.*, The activity and safety of electrochemotherapy in persistent chest wall recurrence from breast cancer after mastectomy: a phase-II study. *Breast cancer research and treatment* **134**, 1169 (Aug, 2012).
262. . (Bologne, Italie, 2013),
263. D. Miklavcic *et al.*, Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Medical & biological engineering & computing* **50**, 1213 (Dec, 2012).
264. P. Scheurich, U. Zimmermann, M. Mischel, I. Lamprecht, Membrane fusion and deformation of red blood cells by electric fields. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences* **35**, 1081 (Nov-Dec, 1980).
265. P. Scheurich, U. Zimmermann, Giant human erythrocytes by electric-field-induced cell-to-cell fusion. *Die Naturwissenschaften* **68**, 45 (Jan, 1981).
266. G. Pilwat, H. P. Richter, U. Zimmermann, Giant culture cells by electric field-induced fusion. *FEBS letters* **133**, 169 (Oct 12, 1981).

267. U. Zimmermann, P. Scheurich, Fusion of *Avena sativa* mesophyll cell protoplasts by electrical breakdown. *Biochim Biophys Acta* **641**, 160 (Feb 20, 1981).
268. P. Scheurich, U. Zimmermann, Electrically Stimulated Fusion of Different Plant Cell Protoplasts : MESOPHYLL CELL AND GUARD CELL PROTOPLASTS OF VICIA FABA. *Plant physiology* **67**, 849 (Apr, 1981).
269. H. Weber, W. Forster, H. E. Jacob, H. Berg, Microbiological implications of electric field effects. III. Stimulation of yeast protoplast fusion by electric field pulses. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* **21**, 555 (1981).
270. U. Zimmermann, J. Vienken, Electric field-induced cell-to-cell fusion. *The Journal of membrane biology* **67**, 165 (1982).
271. H. Mekid, L. M. Mir, In vivo cell electrofusion. *Biochim Biophys Acta* **1524**, 118 (Dec 15, 2000).
272. C. Blangero, M. P. Rols, J. Teissie, Cytoskeletal reorganization during electric-field-induced fusion of Chinese hamster ovary cells grown in monolayers. *Biochim Biophys Acta* **981**, 295 (Jun 6, 1989).
273. Q. A. Zheng, D. C. Chang, Dynamic changes of microtubule and actin structures in CV-1 cells during electrofusion. *Cell motility and the cytoskeleton* **17**, 345 (1990).
274. M. P. Rols, F. Dahhou, J. Teissie, Pulse-first heterofusion of cells by electric field pulses and associated loading of macromolecules into mammalian cells. *BioTechniques* **17**, 762 (Oct, 1994).
275. R. V. Goddard, A. G. Prentice, J. A. Copplestone, E. R. Kaminski, In vitro dendritic cell-induced T cell responses to B cell chronic lymphocytic leukaemia enhanced by IL-15 and dendritic cell-B-CLL electrofusion hybrids. *Clinical and experimental immunology* **131**, 82 (Jan, 2003).
276. K. T. Trevor *et al.*, Generation of dendritic cell-tumor cell hybrids by electrofusion for clinical vaccine application. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **53**, 705 (Aug, 2004).
277. A. Marten *et al.*, Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Human gene therapy* **14**, 483 (Mar 20, 2003).
278. D. E. Avigan *et al.*, Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma. *Journal of immunotherapy* **30**, 749 (Oct, 2007).
279. U. Trefzer *et al.*, Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine* **23**, 2367 (Mar 18, 2005).
280. R. L'Italien, *Immunohématologie*. (Centre Collegial de Developpement de Materiel Didactique, ed., 2008), pp. 541, p. 53.
281. G. Kohler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495 (Aug 7, 1975).
282. J. Vienken, U. Zimmermann, An improved electrofusion technique for production of mouse hybridoma cells. *FEBS letters* **182**, 278 (Mar 25, 1985).
283. M. Pratt, A. Mikhalev, M. C. Glassy, The generation of Ig-secreting UC 729-6 derived human hybridomas by electrofusion. *Hybridoma* **6**, 469 (Oct, 1987).
284. X. Yu, P. A. McGraw, F. S. House, J. E. Crowe, Jr., An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* **336**, 142 (Jul 31, 2008).
285. E. W. Kemna, F. Wolbers, I. Vermes, A. van den Berg, On chip electrofusion of single human B cells and mouse myeloma cells for efficient hybridoma generation. *Electrophoresis* **32**, 3138 (Nov, 2011).
286. K. Trontelj *et al.*, Optimization of bulk cell electrofusion in vitro for production of human-mouse heterohybridoma cells. *Bioelectrochemistry* **74**, 124 (Nov, 2008).
287. C. Dalmay, M. A. De Menorval, O. Francais, L. M. Mir, B. Le Pioufle, A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells. *Lab on a chip* **12**, 4709 (Nov 21, 2012).
288. A. G. Pakhomov *et al.*, Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). *Bioelectromagnetics* **28**, 655 (Dec, 2007).
289. A. N. Panchenko, V. F. Tarasenko, Efficient gas lasers pumped by double-discharge circuits with semiconductor opening switch. *Prog Quant Electron* **36**, 143 (Jan, 2012).
290. A. V. Nazarenko, P. S. Antsiferov, L. A. Dorokhin, K. N. Koshelev, Y. V. Sidel'nikov, A driver of rapidly rising current pulses based on a semiconductor opening switch. *Instrum Exp Tech+* **46**, 54 (Jan-Feb, 2003).
291. P. W. Smith, *Transient Electronics : Pulsed Circuit Technology*. (ed., 2002), pp. J. W. Sons, p.
292. S. V. Voevodin, V. V. Gorokhov, V. I. Karelin, A compact high-voltage nanosecond Marx generator based on air-field dischargers. *Instrum Exp Tech+* **43**, 345 (May-Jun, 2000).



293. M. Sack, R. Stangle, A bipolar Marx generator for a mobile electroporation device. *Pulsed Power Conference, 2007 16th IEEE International* **2**, 1319 (June 2007, 2007).
294. R. E. Matick, Transmission line pulse transformers - Theory and applications. *Proc. IEEE* **56**, 47 (jan 1968, 1968).
295. C. Y. Jiang, S. G. Xia, Q. F. Wang, J. J. He, A Compact Repetitive Nanosecond Pulsed Power Generator Based on Transmission Line Transformer. *Ieee T Dielect El In* **18**, 1194 (Aug, 2011).
296. J. Bac, Contribution à l'étude et à la réalisation de commutateurs et de générateurs haute tension transitoires, Université de Pau et des pays de l'Adour (2005).
297. S. L. Moran, L. W. Hardesty, High-Repetition-Rate Hydrogen Spark Gap. *Ieee T Electron Dev* **38**, 726 (Apr, 1991).
298. K. H. Schoenbach *et al.*, Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *P Ieee* **92**, 1122 (Jul, 2004).
299. I. V. Grekhov, V. M. Efanov, A. F. Kardosysoev, S. V. Shenderey, Power Drift Step Recovery Diodes (Dsrd). *Solid State Electron* **28**, 597 (1985).
300. I. V. Grekhov *et al.*, High-power semiconductor-based nano, and subnanosecond pulse generator with a low delay time. *Ieee T Plasma Sci* **33**, 1240 (Aug, 2005).
301. S. El Amari, A. De Angelis, D. Arnaud-Cormos, V. Couderc, P. Leveque, Characterization of a Linear Photoconductive Switch Used in Nanosecond Pulsed Electric Field Generator. *Ieee Photonic Tech L* **23**, 673 (Jun 1, 2011).
302. S. El Amari *et al.*, Kilovolt, Nanosecond, and Picosecond Electric Pulse Shaping by Using Optoelectronic Switching. *Ieee Photonic Tech L* **22**, 1577 (Nov 1, 2010).
303. A. Silve, Nouveaux dispositifs pour l'application contrôlée d'impulsions électriques nanosecondes et pour la détection de leurs effets sur les cellules. Nouveaux résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant l'électroporperméabilisation des cellules biologiques., Université Paris-SUD (2011).
304. R. Nuccitelli *et al.*, Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 351 (May 5, 2006).
305. R. Nuccitelli *et al.*, A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. *Int J Cancer* **125**, 438 (Jul 15, 2009).
306. T. Tomov, I. Tsoneva, Are the stainless steel electrodes inert? *Bioelectrochemistry* **51**, 207 (Jun, 2000).
307. R. Stapulionis, Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. *Bioelectrochem Bioenerg* **48**, 249 (Feb, 1999).
308. J. W. Loomis-Husselbee, P. J. Cullen, R. F. Irvine, A. P. Dawson, Electroporation can cause artefacts due to solubilization of cations from the electrode plates. Aluminum ions enhance conversion of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate into inositol 1,4,5-trisphosphate in electroporated L1210 cells. *Biochem J* **277** ( Pt 3), 883 (Aug 1, 1991).
309. P. T. Vernier, Mitochondrial membrane permeabilization with nanosecond electric pulses. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2011**, 743 (2011).
310. T. B. Napotnik, Y. H. Wu, M. A. Gundersen, D. Miklavcic, P. T. Vernier, Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics* **33**, 257 (Apr, 2012).
311. S. Romeo *et al.*, DNA electrophoretic migration patterns change after exposure of Jurkat cells to a single intense nanosecond electric pulse. *PLoS One* **6**, e28419 (2011).
312. M. Stacey *et al.*, Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis. *Mutat Res-Gen Tox En* **542**, 65 (Dec 9, 2003).
313. A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, R. Y. Tsien, Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2135 (Mar 2, 1999).
314. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The cell : a molecular approach*. (ed., 2007), pp. 848, p. 329.
315. P. T. Vernier *et al.*, Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 286 (Oct 17, 2003).
316. D. Yin *et al.*, Cutaneous papilloma and squamous cell carcinoma therapy utilizing nanosecond pulsed electric fields (nsPEF). *PLoS One* **7**, e43891 (2012).
317. E. B. Garon *et al.*, In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies. *International Journal of Cancer* **121**, 675 (Aug 1, 2007).
318. R. M. Paredes, J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, J. D. Lechleiter, Chemical calcium indicators. *Methods* **46**, 143 (Nov, 2008).
319. T. Jellerette *et al.*, Characterization of calcium oscillation patterns in caprine oocytes induced by IVF or an activation technique used in nuclear transfer. *Theriogenology* **65**, 1575 (May, 2006).

320. N. M. Woods, K. S. Cuthbertson, P. H. Cobbold, Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes. *Cell Calcium* **8**, 79 (Feb, 1987).
321. R. Jacob, Imaging cytoplasmic free calcium in histamine stimulated endothelial cells and in fMet-Leu-Phe stimulated neutrophils. *Cell Calcium* **11**, 241 (Feb-Mar, 1990).
322. M. J. Berridge, A. Galione, Cytosolic calcium oscillators. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2**, 3074 (Dec, 1988).
323. M. J. Berridge, Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315 (Jan 28, 1993).
324. R. H. Lee *et al.*, Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* **14**, 311 (2004).
325. B. Lindroos, R. Suuronen, S. Miettinen, The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev* **7**, 269 (Jun, 2011).
326. M. P. De Miguel *et al.*, Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Curr Mol Med* **12**, 574 (Jun, 2012).
327. S. Deslex, R. Negrel, C. Vannier, J. Etienne, G. Ailhaud, Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* **11**, 19 (1987).
328. P. A. Zuk *et al.*, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279 (Dec, 2002).
329. P. A. Zuk *et al.*, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211 (Apr, 2001).
330. H. Hauner *et al.*, Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* **84**, 1663 (Nov, 1989).
331. A. Sen *et al.*, Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* **81**, 312 (Mar 26, 2001).
332. J. Gimble, F. Guilak, Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* **5**, 362 (2003).
333. Y. C. Halvorsen, W. O. Wilkison, J. M. Gimble, Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4**, S41 (Nov, 2000).
334. Y. D. Halvorsen *et al.*, Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* **7**, 729 (Dec, 2001).
335. A. Reinisch *et al.*, Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med* **2**, 371 (Jul, 2007).
336. J. E. Hudson *et al.*, A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells Dev* **20**, 77 (Jan, 2011).
337. M. M. Bonab *et al.*, Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *Bmc Cell Biol* **7**, (Mar 10, 2006).
338. M. E. Wall, S. H. Bernacki, E. G. Lobo, Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* **13**, 1291 (Jun, 2007).
339. S. Kawano *et al.*, Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **32**, 165 (Oct, 2002).
340. M. Dominici *et al.*, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315 (Aug, 2006).
341. A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, K. S. Lalykina, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* **3**, 393 (Oct, 1970).
342. A. Erices, P. Conget, J. J. Minguell, Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109**, 235 (Apr, 2000).
343. C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F. P. Luyten, Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1928 (Aug, 2001).
344. S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey, S. Shi, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13625 (Dec 5, 2000).
345. J. G. Toma, I. A. McKenzie, D. Bagli, F. D. Miller, Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem cells* **23**, 727 (Jun-Jul, 2005).
346. J. T. Williams, S. S. Southerland, J. Souza, A. F. Calcutt, R. G. Cartledge, Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *The American surgeon* **65**, 22 (Jan, 1999).
347. N. J. Zvaifler *et al.*, Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* **2**, 477 (2000).

348. C. Maniopoulos, J. Sodek, A. H. Melcher, Bone-Formation Invitro by Stromal Cells Obtained from Bone-Marrow of Young-Adult Rats. *Cell Tissue Res* **254**, 317 (1988).
349. M. M. Wong *et al.*, Long-Term Effects of Physiological Concentrations of Dexamethasone on Human Bone-Derived Cells. *J Bone Miner Res* **5**, 803 (Aug, 1990).
350. B. A. Ashton *et al.*, Formation of Bone and Cartilage by Marrow Stromal Cells in Diffusion-Chambers Invivo. *Clin Orthop Relat R*, 294 (1980).
351. I. Bab *et al.*, Kinetics and Differentiation of Marrow Stromal Cells in Diffusion-Chambers Invivo. *J Cell Sci* **84**, 139 (Aug, 1986).
352. S. Kaneko, S. Motomura, H. Ibayashi, Differentiation of Human-Bone Marrow-Derived Fibroblastoid Colony-Forming Cells (Cfu-F) and Their Roles in Hematopoiesis Invitro. *Brit J Haematol* **51**, 217 (1982).
353. M. Shionome, T. Shinki, N. Takahashi, K. Hasegawa, T. Suda, 1-Alpha,25-Dihydroxyvitamin-D3 Modulation in Lipid-Metabolism in Established Bone Marrow-Derived Stromal Cells, Mc3t3-G2/Pa6. *Journal of Cellular Biochemistry* **48**, 424 (Apr, 1992).
354. G. Ferrari *et al.*, Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528 (Mar 6, 1998).
355. M. N. Duong, Y. T. Ma, R. C. Chiu, Bone marrow stem cells. *Methods in molecular biology* **1036**, 33 (2013).
356. P. L. Kang *et al.*, Nano-sized collagen I molecules enhanced the differentiation of rat mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Journal of biomedical materials research. Part A*, (Mar 5, 2013).
357. G. C. Kopen, D. J. Prockop, D. G. Phinney, Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10711 (Sep 14, 1999).
358. D. Woodbury, E. J. Schwarz, D. J. Prockop, I. B. Black, Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**, 364 (Aug 15, 2000).
359. X. Dong *et al.*, Modification of histone acetylation facilitates hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PloS one* **8**, e63405 (2013).
360. X. J. Dong, H. Zhang, R. L. Pan, L. X. Xiang, J. Z. Shao, Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World journal of gastroenterology : WJG* **16**, 3267 (Jul 14, 2010).
361. C. Moriscot *et al.*, Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem cells* **23**, 594 (Apr, 2005).
362. C. Chang, D. Niu, H. Zhou, F. Li, F. Gong, Mesenchymal stem cells contribute to insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Transplantation proceedings* **39**, 3363 (Dec, 2007).
363. F. J. Adegani *et al.*, A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Mol Biol Rep* **40**, 3693 (May, 2013).
364. T. J. Kim *et al.*, Substrate rigidity regulates Ca<sup>2+</sup> oscillation via RhoA pathway in stem cells. *J Cell Physiol* **218**, 285 (Feb, 2009).
365. S. Kawano, K. Otsu, S. Shoji, K. Yamagata, M. Hiraoka, Ca(2+) oscillations regulated by Na(+)-Ca(2+) exchanger and plasma membrane Ca(2+) pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **34**, 145 (Aug, 2003).
366. S. Kawano *et al.*, ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **39**, 313 (Apr, 2006).
367. R. R. Resende *et al.*, Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells. *Bba-Mol Cell Res* **1803**, 246 (Feb, 2010).
368. R. Callaghan, L. C. van Gorkom, R. M. Epand, A comparison of membrane properties and composition between cell lines selected and transfected for multi-drug resistance. *British journal of cancer* **66**, 781 (Nov, 1992).
369. M. Dominici *et al.*, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315 (2006).
370. S. Sun, Y. Liu, S. Lipsky, M. Cho, Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 1472 (May, 2007).
371. M. B. Sankaram, T. E. Thompson, Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8686 (Oct 1, 1991).

372. F. M. Andre, L. M. Mir, Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects. *Curr Gene Ther* **10**, 267 (Aug, 2010).
373. F. Guilak *et al.*, Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* **206**, 229 (Jan, 2006).
374. A. F. Liew A, Lesueur LL, De Ménorval MA, O'Brien T, Mir LM, Robust, efficient and practical electrogene transfer method for human Mesenchymal Stem Cells using square electric pulses. *Human Gene Therapy Methods in press*, (2013).
375. A. Randoux, *Biochimie dynamique*. (De Boeck Supérieur, ed., 1997), pp. 938, p. 223.
376. R. R. Resende *et al.*, Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 246 (Feb, 2010).
377. R. P. Joshi *et al.*, Simulations of intracellular calcium release dynamics in response to a high-intensity, ultrashort electric pulse. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **75**, 041920 (Apr, 2007).
378. A. Silve, I. Leray, L. M. Mir, Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10ns electric pulse. *Bioelectrochemistry*, (Oct 12, 2011).
379. P. T. Vernier, Y. Sun, M. A. Gundersen, Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *Bmc Cell Biol* **7**, 37 (2006).
380. H. Melkonyan, C. Sorg, M. Klempt, Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic acids research* **24**, 4356 (Nov 1, 1996).
381. C. Sanmartin-Suarez, R. Soto-Otero, I. Sanchez-Sellero, E. Mendez-Alvarez, Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Tox Met* **63**, 209 (Mar-Apr, 2011).
382. I. A. Silve A., Mir LM, in *5th European Conference on Antennas and Propagation (EUCAP)*. (Roma, Italy, 2011),
383. O. N. Pakhomova *et al.*, Electroporation-Induced Electrosensitization. *PLoS one* **6**, (Feb 9, 2011).
384. K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, E. S. Buescher, Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* **22**, 440 (Sep, 2001).
385. J. A. White, P. F. Blackmore, K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 22964 (May 28, 2004).
386. S. J. Beebe, P. M. Fox, L. J. Rec, L. K. Willis, K. H. Schoenbach, Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *Faseb Journal* **17**, 1493 (Jun, 2003).
387. G. L. Craviso, S. Choe, P. Chatterjee, I. Chatterjee, P. T. Vernier, Nanosecond Electric Pulses: A Novel Stimulus for Triggering Ca<sup>2+</sup> Influx into Chromaffin Cells Via Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 1259 (Nov, 2010).
388. J. L. Biedler, H. Riehm, Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* **30**, 1174 (Apr, 1970).
389. A. Liew *et al.*, Robust, efficient and practical electrogene transfer method for human Mesenchymal Stem Cells using square electric pulses. *Human gene therapy methods*, (Aug 9, 2013).
390. A. Silve, R. Vezinet, L. M. Mir, Nanosecond-Duration Electric Pulse Delivery In Vitro and In Vivo: Experimental Considerations. *Ieee T Instrum Meas* **61**, 1945 (Jul, 2012).
391. C. Dalmay *et al.*, Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultra-short pulses of electrical field to living cells. *Sensor Actuat B-Chem* **160**, 1573 (Dec 15, 2011).
392. M. Kanaan *et al.*, Characterization of a 50-Omega Exposure Setup for High-Voltage Nanosecond Pulsed Electric Field Bioexperiments. *Ieee T Bio-Med Eng* **58**, 207 (Jan, 2011).



## **Annexes**



# **Annexe 1**

## **Article 4 : Robust, Efficient, and Practical Electroporation Transfer Method for Human Mesenchymal Stem Cells Using Square Electric Pulses**

Liew A, André FM, Lesueur LL, De Ménorval MA, O'Brien T and Mir LM

Hum Gene Ther Methods. 2013 ; 24 : 1

Cet article a été publié dans le cadre d'une collaboration avec une équipe irlandaise (Liew A and O'Brien T). Il relate un protocole *in vitro* d'électrotransfert de gène (pCMV-GFP) simple mais robuste et efficace appliqué à des cellules primaires, les hMSC. Deux types de hMSC ont été utilisés : des cellules issues de la moelle osseuse (les hbMSC) et des cellules issues du tissu adipeux (les haMSC). Le protocole utilisant des impulsions microseconde rectangulaires a été optimisé en augmentant la concentration en plasmide utilisée (52 µg de plasmide pour 100 µL de suspension cellulaire). De plus, l'efficacité de transfection a été améliorée par l'ajout de 50% d'eau dans le milieu de transfection (S-MEM) à l'origine d'un choc osmotique. Cette optimisation a permis d'atteindre un taux de transfection pouvant atteindre 95% et une viabilité de 70%. L'expression du gène transfecté était encore détectable jusqu'à un mois après la transfection. L'introduction non intégrative du plasmide pCMV-GFP n'a pas affecté les potentiels de différenciation de ces hMSC.

De plus, l'électrotransfert de gène est un protocole beaucoup plus sûr que les transferts de gènes par méthodes virales qui peuvent, d'une part poser des problèmes de sécurité dus à l'intégration du gène d'intérêt (pour les virus intégratifs) et d'autre part, présenter des problèmes d'immunogénicité (pour tous les types de virus).

J'ai participé à l'isolation des haMSC puis à la mise en place de la culture des haMSC et des hbMSC. J'ai aussi participé à la caractérisation des deux types de hMSC et à la mise en place du protocole de différenciation de ces cellules.

Les cellules haMSC sont les cellules que j'ai utilisé pour le troisième article de ma thèse 'reproduction des oscillations calciques des haMSC par des impulsions électriques adaptées, en présence ou en absence de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire.



# Robust, Efficient, and Practical Electrogene Transfer Method for Human Mesenchymal Stem Cells Using Square Electric Pulses

Aaron Liew,<sup>1,\*</sup> Franck M. André,<sup>2–4,\*</sup> Léa L. Lesueur,<sup>2–4</sup>  
 Marie-Amélie De Ménorval,<sup>2–4</sup> Timothy O'Brien,<sup>1</sup> and Lluís M. Mir<sup>2–4</sup>

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent nonhematopoietic cells with the ability to differentiate into various specific cell types, thus holding great promise for regenerative medicine. Early clinical trials have proven that MSC-based therapy is safe, with possible efficacy in various diseased states. Moreover, genetic modification of MSCs to improve their function can be safely achieved using electrogene transfer. We previously achieved transfection efficiencies of up to 32% with preserved viability in rat MSCs. In this study, we further improved the transfection efficiency and transgene expression in human MSCs (hMSCs), while preserving the cell viability and ability to differentiate into osteoblasts and adipocytes by increasing the plasmid concentration and altering the osmotic pressure of the electrotransfer buffer. Using a square-wave electric pulse generator, we achieved a transfection efficiency of more than 80%, with around 70% viability and a detectable transgene expression of up to 30 days. Moreover, we demonstrated that this transfection efficiency can be reproduced reliably on two different sources of hMSCs: the bone marrow and adipose tissue. We also showed that there was no significant donor variability in terms of their transfection efficiency and viability. The cell confluency before electrotransfer had no significant effect on the transfection efficiency and viability. Cryopreservation of transfected cells maintained their transgene expression and viability upon thawing. In summary, we are reporting a robust, safe, and efficient protocol of electrotransfer for hMSCs with several practical suggestions for an optimal use of genetically engineered hMSCs for clinical application.

## Introduction

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) are multipotent, nonhematopoietic, fibroblast-like plastic adherent cells with specific surface phenotype and trilineage differentiation ability into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes (Barry and Murphy, 2004). MSC-based therapy has been utilized for both tissue engineering and regenerative medicine. However, the therapeutic efficiency of the MSCs may be attenuated partly by the intrinsic disease-related dysfunction, and therefore genetic manipulation may be essential to augment MSCs' function before transplantation (Griffin *et al.*, 2010). We have previously performed a direct comparison of both viral and nonviral methods of transfection of MSCs and have shown that

lentivirus approach had the most optimal transfection efficiency with highest cell viability followed by adenovirus approach (McMahon *et al.*, 2006). However, the host immune response associated with adenovirus- and lentivirus-associated genomic integration raised a valid concern regarding their *in vivo* efficacy and long-term safety profiles (Ferreira *et al.*, 2008; Helledie *et al.*, 2008). On the other hand, we have previously shown that under the manufacturer's protocol, electrotransfer using exponentially decaying pulses was ineffective and associated with substantial cell death (McMahon *et al.*, 2006). Nonetheless, Helledie *et al.* (2008) had later optimized the parameters of the electrotransfer of human MSCs (hMSCs), using exponential decaying pulses, which resulted in up to 90% stable transfection efficiency but with about 50% cell viability.

<sup>1</sup>Regenerative Medicine Institute, National Centre for Biomedical Engineering Science, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

<sup>2</sup>Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Université Paris-Sud, Orsay 91405, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, CNRS, Orsay 91405, France.

<sup>4</sup>Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, Institut Gustave Roussy, Villejuif 94805, France.

\*These two authors contributed equally to this work.

Using square-wave electric pulses, we had previously optimized the electrogene transfer (EGT) of rat MSCs and were able to achieve a transfection efficiency of up to 32% with up to 70% viability (Ferreira *et al.*, 2008). Indeed, the square-wave electric pulses are very efficient for *in vivo* EGT and also for treatment of solid tumors by permeabilizing the cancer cells to nonpermeant chemotherapeutic drugs (electrochemotherapy) (Mir *et al.*, 2003; Mir, 2006). Furthermore, repeated courses of electrochemotherapy are proven to be safe and well tolerated in humans (Quaglino *et al.*, 2008). In fact, *in vivo* EGT utilizing square-pulse generators such as the Cliniporator has been optimized for various tissue types, including muscle, liver, and skin (Andre *et al.*, 2008). Most importantly, its safety profile has been established (Hojman *et al.*, 2008). Therefore, in the present study, we sought to further optimize the transfection efficiency using square-wave electric pulses and hMSCs for clinical application.

## Materials and Methods

### Bone marrow-derived MSC isolation

Bone marrow aspirates obtained from the iliac crest of healthy donors were purchased from Lonza. MSCs were isolated by direct plating of whole marrow and expanded in culture as described previously (Cepurniene *et al.*, 2010). Briefly, aspirates were washed with the culture medium (minimum essential medium alpha [Gibco/Invitrogen] containing 1% antibiotic and 10% selected fetal bovine serum [FBS]) and centrifuged. The precipitated cells were suspended in the culture medium and plated at a final density of  $3.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. Cells were seeded on T-175 flasks and maintained at 37°C with 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> in the same culture medium. After 5 days of plating, red blood cells were washed off with phosphate-buffered saline (PBS), and a fresh culture medium was added. Colonies of adherent cells were formed within 9 days. At the end of primary culture, adherent colonies were detached by treatment with 0.25% trypsin and 0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid. Cells were plated in the culture medium at a density of  $5.7 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. Cultures were passaged at 4–6-day intervals, and MSCs at passages 2–5 were used for all experiments.

### Adipose tissue-derived MSC isolation

Adipose tissue-derived MSCs (AT-MSCs) were obtained, following informed consent, from lipoaspirates of healthy donors undergoing elective lipoaspiration. Lipoaspirates were washed extensively with sterile PBS to remove contaminating debris and red blood cells. Washed aspirates were digested with 0.2% collagenase (type I; Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min at 37°C with gentle agitation. On completion of the digestion period, FBS was added to a final concentration of 10% to stop collagenase activity. The stromal vascular fraction was separated by centrifugation at room temperature ( $400 \times g$  for 5 min). The stromal pellet was resuspended in PBS and filtered through a 100  $\mu$ m mesh filter to remove debris. The collected cells were centrifuged ( $400 \times g$  for 5 min), plated on T-175 flasks, and maintained at 37°C with 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> in their culture medium (minimum essential medium alpha [Gibco/Invitrogen] containing 1% antibiotic and 10% FBS). After 5 days, the cells were washed with PBS to remove nonadherent cells and a

fresh medium was added. Upon reaching 70–80% confluency, these cells were detached with TrypLE Express and expanded up to passage 5 for experimentation. AT-MSCs were characterized between passages 1 and 5 by flow cytometric analysis (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertonline.com/hgtb](http://www.liebertonline.com/hgtb)). Their adipogenic and osteogenic differentiation potential was also checked (Supplementary Fig. S2).

### Analysis of surface antigens

Expression of MSC surface markers was verified by flow cytometry using the following antibodies: mouse antihuman CD44 conjugated with allophycocyanin, mouse antihuman CD105 conjugated with biotin, mouse antihuman CD90 conjugated with phycoerythrin, mouse antihuman CD34 conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), and peridinin chlorophyll protein complex-conjugated mouse antihuman CD45 (all antibodies were purchased from Miltenyi). The secondary antibody streptavidin-FITC was obtained from Sigma-Aldrich. For each antibody, appropriate isotypes were tested. Briefly, cells were trypsinized and resuspended at 100,000 cells per 100  $\mu$ l in staining buffer containing PBS with 2 mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin. Antibodies were added at appropriate concentrations (according to the manufacturer's instructions) and incubated for 10 min at 4–8°C in the dark. To reveal CD105-biotin labeling, cells were incubated with streptavidin-FITC at 0.5  $\mu$ g/ml concentration for 10 min at 4–8°C in the dark. Then, cells were washed by adding 2 ml of staining buffer and centrifuged at  $300 \times g$  for 10 min. Supernatant was removed, and cells were resuspended in staining buffer, analyzed on an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences), and compared with unstained control cells.

### Assessment of the adipogenic and osteogenic differentiation potential

For the characterization of the adipogenic differentiation, cells were cultured for 3 days in adipogenic medium containing DMEM containing 1% antibiotic and 10% FBS with 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin, 200  $\mu$ M indomethacin, and 500  $\mu$ M 3-isobutylmethylxanthine and then cultured for 1 day in their regular maintenance medium (minimum essential medium alpha [Gibco/Invitrogen] containing 1% antibiotic and 10% FBS) supplemented with 10  $\mu$ g/ml insulin. This cycle was repeated once, and after 7 days, cells were fixed and stained with Oil red O to detect lipid vacuoles and with FABP-4 antibody to detect the fatty acid-binding protein characteristic of adipocytes. For the characterization of the osteogenic differentiation, cells were cultured in osteogenic medium containing complete alpha-MEM (with 1% antibiotic and 10% FBS) with 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 200  $\mu$ M L-ascorbic acid 2-phosphate, and 10 mM glycerol-2-phosphate. This medium was changed every 2–3 days. After 14–30 days, cells were fixed and stained with alizarin red to detect accumulation of deposited calcium.

### Electrotransfection

Cells were trypsinized, centrifuged at  $500 \times g$  for 10 min, resuspended in MEM, and modified for suspension cultures, without calcium and without glutamine (S-MEM)

## ROBUST AND EFFICIENT DNA ELECTROTRANSFER IN hMSC

3

(Invitrogen ref. 11380037). MSC suspension was then mixed with the pCMV-GFP plasmid (PlasmidFactory) that carries the GFP reporter gene under the control of the cytomegalovirus promoter. For the experiments requiring large amount of reporter plasmid, a  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  stock solution was concentrated by evaporation to prepare a stock solution at  $20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . This  $20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  stock solution was visibly more viscous and was pipetted slowly to avoid bubble formation. Moreover, accurate volume pipetting was ensured by using the reverse pipetting technique. About 500,000 cells in  $50\text{ }\mu\text{l}$  of S-MEM containing  $8\text{--}52\text{ }\mu\text{g}$  of pCMV-GFP plasmid were then transferred to each 1 mm electroporation cuvette (Cell Projects), and electrotransfection was performed using the cliniporator device (IGEAs) by applying a train of eight square electric pulses ( $100\text{ }\mu\text{sec}$ ) at amplitude ranges of  $1500\text{--}2000\text{ V/cm}$  at a 1 Hz repetition frequency. All steps were performed at room temperature. After electrotransfection, the cells were collected and put back into  $25\text{ cm}^2$  flasks for culture with 5 ml of the culture medium.

### *Assessment of transgene expression and cell survival by flow cytometry*

At different time points after the electrotransfection, cells were washed with PBS to remove debris, and dead cells were analyzed by flow cytometry on a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) to evaluate the levels of GFP expression and the cell numbers using the BD Accuri CFlow Plus software. Electrotransfected cells were compared with sham electrotransfected controls (no plasmid, no addition of water, and no pulses). The transfection efficiency is expressed as the percentage of surviving cells expressing the GFP, and the survival is expressed as the percentage of cells recovered versus the sham electrotransfected controls.

### *Assessment of the electrotransfected MSCs*

Two MSC controls were performed in parallel: one had no DNA added and was not electropulsed, and the other was electropulsed but without DNA. MSCs were maintained in culture for 7 days after electrotransfer and then analyzed by flow cytometry for CD44 and CD90 expression (Supplementary Fig. S3).

To verify maintenance of MSCs' adipogenic and osteogenic differentiation potential, MSCs were induced to differentiate into adipose and osteoblastic lineages. Two days after the electric pulses treatment, electrotransferred MSCs were seeded into 24-well plates at  $15,000\text{ cells}/\text{cm}^2$ . After 2 days of growth, the differentiation medium was added as described previously, and Oil red O and Alizarin red staining were performed several days later (Supplementary Fig. S4).

For proliferation assays, MSCs were trypsinized 4 days after the electrotransfection, plated in 6-well plates at  $30\text{ cells}/\text{cm}^2$ , and cultured for 11 days. MSCs were then trypsinized, stained with Trypan Blue, and counted on a Biorad TC20 Automated Cell Counter (Supplementary Fig. S5).

### *Statistical analysis*

All data are presented as mean  $\pm$  SEM, and the number of repeat ( $n$ ) is reported in the legend of the figures. One-way analysis of variance with Bonferroni's multiple comparison test was used for statistical analysis for multiple comparisons

among the groups. *T*-test or Mann–Whitney test were used for comparison between two groups.  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### *Reproducible hMSC transfection efficiency irrespective of donors or tissue source*

We sought to compare the transfection efficiency of two different sources of hMSCs (bone marrow vs. adipose tissue) using our electrotransfer parameters previously optimized on rat MSCs (Ferreira *et al.*, 2008). The transfection efficiency was assessed 24 hr after the electrotransfer. Bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) and AT-MSCs between passages 2 and 4 were used in these experiments. Figure 1a shows that there was no difference in the transfection efficiency (mean transfection efficiency 33%) of BM-MSCs among four different donors. Similarly, there was no significant effect of donor variability on transfection efficiency (mean transfection efficiency of 28%) of AT-MSCs derived from four donors (Fig. 1b). However, the overall transfection efficiency was slightly, but significantly, higher in BM-MSCs than in AT-MSCs (33% vs. 28%;  $p = 0.049$ , Mann–Whitney test). Average survival was about 69% with no difference between donors or tissue sources.

### *Reproducible MSC transfection efficiency irrespective of the delay between EGT and thawing*

Since cells are usually frozen after their isolation and initial expansion, and since it might not be possible to electrotransfect these cells every time after a very precise post-thawing period, we first examined how the delay between thawing and EGT could affect the transfection efficiency of the procedure. Efficiency was about 35% when EGT was performed as early as 24 hr after thawing (Fig. 1c). The transfection efficiency remained similar if the EGT was delayed up to 7 days post-thaw, meaning that EGT is not influenced by the time after the thawing of the cells. Average survival was about 72% in all electrotransferred groups compared with control groups.

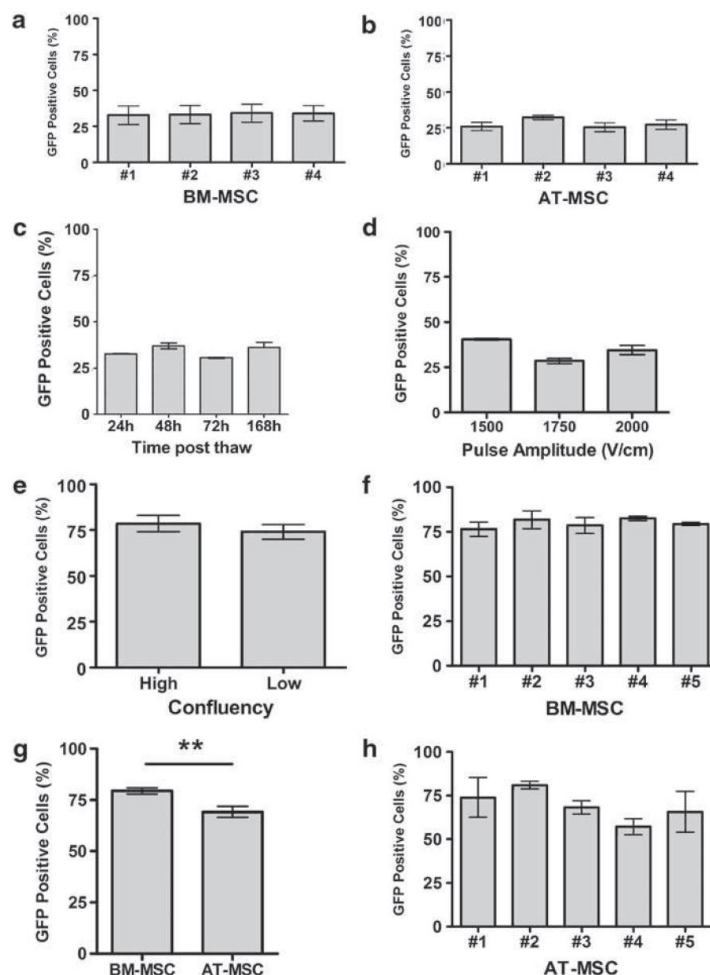
### *No improvement of transfection efficiency with pulse amplitudes beyond $1500\text{ V/cm}$*

Transfection efficiency proved to be robust but still sub-optimal. Therefore, we investigated if transfection efficiency could be improved by increasing the amplitude of the electric pulses applied. We have previously shown in rat MSCs that increasing the amplitude of the electric pulse beyond  $1500\text{ V/cm}$  results in increased transfection efficiency but with increased variability and toxicity (Ferreira *et al.*, 2008). In human BM-MSCs, increased toxicity (67%, 56%, and 31% survival for 1500, 1750, and  $2000\text{ V/cm}$ , respectively) and variability were observed but without increased transfection (Fig. 1d). Therefore, the electric parameters were fixed at eight electric pulses ( $100\text{ }\mu\text{s}$ ) of  $1500\text{ V/cm}$  at a 1 Hz repetition frequency for the remaining of the study.

### *Improvement of transfection efficiency by increasing plasmid concentration*

Another way to improve EGT efficiency is by increasing the plasmid concentration. The increase from 8 to  $28\text{ }\mu\text{g}$  of





**FIG. 1.** Reproducibility of the electrotransfer protocol. **(a and b)** Reproducible transfection efficiency of MSCs irrespective of donors or tissue source. BM-MSCs **(a)** and AT-MSCs **(b)** derived from eight different donors ( $n=5$ ,  $p=1.00$  **(a)** and  $p=0.33$  **(b)**, one-way ANOVA) were electrotransfected (1500 V/cm, 8  $\mu$ g of plasmid in S-MEM). **(c)** Reproducible transfection efficiency of MSCs irrespective of the time post-thaw ( $n=3$  except for group 168 hr where  $n=8$ ,  $p=0.67$ , one-way ANOVA). **(d)** Decreased percentage of transfected cells when the pulse amplitude is increased beyond 1500 V/cm ( $n=3$ ,  $p<0.05$ , one-way ANOVA). **(e)** Reproducible transfection efficiency of MSCs irrespective of pretreatment confluency (40% or 80%) ( $p=0.53$ , unpaired  $t$ -test). **(f-h)** Reproducibility of the improved electrotransfer protocol (1500 V/cm, 52  $\mu$ g of plasmid in S-MEM with 40% water). No effect of donor variability on transfection efficiency of BM-MSCs **(f)** ( $n=3$  except for BM-MSCs#1 where  $n=4$ ,  $p=0.75$ , one-way ANOVA) and AT-MSCs **(h)** ( $n=3$ ,  $p=0.05$ , Kruskal-Wallis one-way ANOVA) derived from 10 different donors. **(g)** Slightly higher overall transfection efficiency in BM-MSCs as compared with AT-MSCs (79% vs. 69%,  $p<0.01$ , Mann-Whitney test). ANOVA, analysis of variance; AT-MSCs, adipose tissue-derived MSCs; BM-MSCs, bone marrow-derived MSCs; MSCs, mesenchymal stem cells.

plasmid resulted in a nonsignificant increase in transfection efficacy (Bonferroni's multiple comparison test). However, a further increase in plasmid concentration of up to 52  $\mu$ g resulted in a highly significant improvement in the transfection efficacy ( $p<0.01$ ; Bonferroni's multiple comparison test), which peaked at more than 60% of fluorescent cells 1 day after the electrotransfer (Fig. 2). Increasing the concentration of plasmid did not affect the survival rates, which remained around 69%. However, we noted that it was difficult to pipette and homogenize the highly concentrated and viscous plasmid stock solution required for experiments using 52  $\mu$ g of plasmid.

#### Improvement of transfection efficiency by addition of water

Changes in transfection medium osmolarity have been found to modulate the transfection efficiency *in vitro* (Golzio

*et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002). Therefore, we explored the effects of adding water to the cell suspension on the amplitude of the transgene expression. We found that S-MEM with 40% of water achieved the highest transfection efficiency as compared with 20% or 60% of water (data not shown). Using S-MEM with 40% of water, we obtained a threefold increase in GFP expression per cell (Fig. 3a). Moreover, the percentage of transfected cells was increased from 61% to 86% in average (Fig. 3b) with no effect on the cell survival, which remained at an average of 70%.

#### Sustained GFP expression in the MSCs electrotransfected under optimized conditions

Noteworthy, under these optimized parameters (higher plasmid concentration and addition of water), the onset of the reduction in the percentage of transfected cells occurred later and the GFP-positive cells were detected for a longer

## ROBUST AND EFFICIENT DNA ELECTROTRANSFER IN HMSC

5

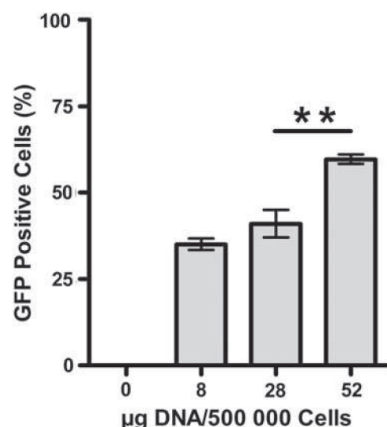


FIG. 2. Increase in transfection efficiency using increasing concentration of plasmid ( $n=3$  except for group 8  $\mu\text{g}$ , where  $n=16$ ,  $p<0.0001$ , one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test).

duration (Fig. 4a). The intensity of GFP expression followed the same trend (Fig. 4b).

#### Maintenance of MSC phenotype after electrotransfer

It was important to show that MSCs maintained their stem cell phenotype after plasmid electrotransfer under optimized conditions (50  $\mu\text{g}$  of plasmid and 50% of water). Several parameters were thus assessed: flow cytometric analysis, adipogenic and osteogenic differentiation, and proliferation potential (Supplementary Figs. S3–S5).

One characteristic of MSCs is the expression of specific stem cell surface antigens. MSCs were therefore maintained in culture for 7 days after the electrotransfer and then analyzed by flow cytometry for CD44 and CD90 expression as well as GFP expression (Supplementary Fig. S3). Electrotransfected MSCs showed similar cell surface marker expression compared with nontransfected and mock (no DNA) transfected MSCs. Moreover, in the electrotransfected cultures, we observed more than 90% GFP-positive cells, indicating that the electrotransfected cells were still expressing the similar cell surface antigens.

Another important feature of MSCs is their ability to undergo adipogenic and osteogenic differentiation. Therefore, 2 days after the electrotransfer, MSCs were seeded at high

density and cultures were changed to osteogenic, adipogenic, or control media 2 days later. Cultures were then stained for calcium or lipid detection (Supplementary Fig. S4). The electrotransfected MSCs and the nontransfected and the mock-transfected cultures supported osteogenic and adipogenic differentiation. Since more than 90% of the cells in the electrotransfected cultures were GFP-positive, it means that the successfully transfected cells were still able to differentiate.

We then tested the proliferation of electrotransferred cultures compared with nontransfected and mock-transfected cells. Four days after the electrotransfection, MSCs were seeded at low density (30 cells/ $\text{cm}^2$ ) in multiwell plates, and after 11 days, cell numbers were determined from three wells of each culture. Again, the electrotransfected MSC cultures yielded similar cell growth rates compared with nontransfected and mock-transfected cultures (Supplementary Fig. S5).

#### No effect of pretreatment confluency on EGT efficiency

The effect of two cell confluency levels (80% vs. 40% cell confluency) before EGT was assessed using our optimized conditions. We demonstrated that these levels of confluency did not affect the transfection efficiency or the survival rates.

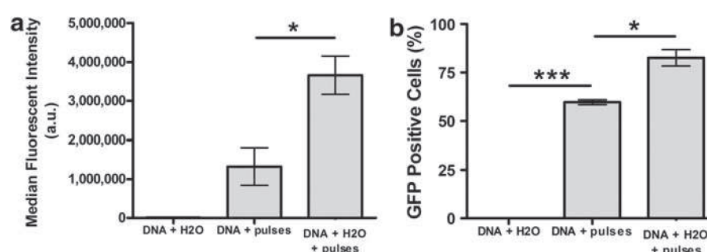
#### Donor and tissue effect on transfection efficiency with optimized protocol

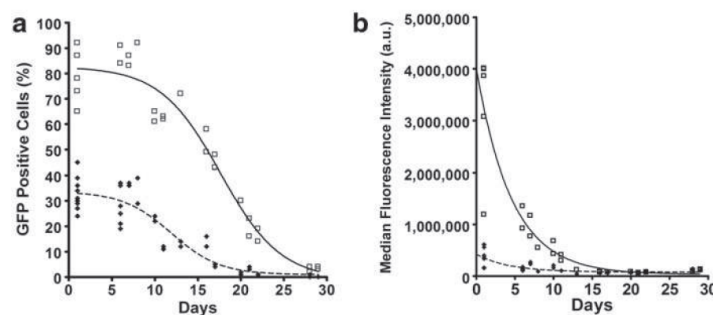
We sought to compare the transfection efficiency of two different sources of MSCs (bone marrow vs. adipose tissue) using the optimized electrotransfer parameters. Using the same parameters, the transfection efficiency of MSCs derived from different donors was compared again. There was no significant difference in the transfection efficiency or viability among the MSCs derived from either bone marrow or adipose tissue obtained from five different donors each (Fig. 1f and h). However, the BM-MSCs were statistically more efficiently transfected than the adipose-derived MSCs (Fig. 1g).

#### Preservation of transgene expression after cryogenic storage

Some electrotransferred MSCs (52  $\mu\text{g}$  DNA and 40% water) were frozen down 24 hr after the EGT, kept at  $-80^\circ\text{C}$  for 65 days, and then thawed, re-cultured, and expanded and the transgene expression followed over time (Fig. 5). These frozen cells showed similar transgene expression kinetics as the nonfrozen cells with GFP-positive cells detectable for 30 days after their thawing (95 days post-EGT).

FIG. 3. (a) Increase of median GFP expression per cell by using S-MEM with 40% of water. (b) Increase in percentage of cells expressing GFP after addition of 40% water ( $n=3$  except for group DNA+H<sub>2</sub>O+pulses, where  $n=7$ ,  $p<0.01$  (a) and  $p<0.0001$  (b), one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test).





**FIG. 4.** Kinetics of GFP expression in the MSCs electrotransfected under optimized conditions. MSCs were pulsed in S-MEM with 40% water and 52 µg of plasmid (white squares) or in S-MEM with 8 µg of plasmid (black diamonds). Optimization of the electrotransfer protocol extends both the level and the duration of GFP expression. The percentage of transfected cells remained stable for a week (a). However, the intensity of GFP expression started to decrease at a much earlier time point (b).

## Discussion

Adult primary cells such as hMSCs are often difficult to transfect with traditional techniques, which limits their use as host cells for gene therapy, as well as for mechanistic studies *in vitro*. Moreover, DNA transfer has to be mediated by a technique that does not affect proliferation and differentiation to allow for *in vitro* analysis of hMSCs, and their subsequent use for transplantation.

Some lipofection reagents are able to transfect up to 50% of the treated hMSCs (Hoelters *et al.*, 2005); however, cytotoxic effects that can potentially alter hMSC phenotype have restricted their use (Uchida *et al.*, 2002; Helledie *et al.*, 2008).

Transduction of hMSCs with lentiviruses displayed great transfection potential. On the contrary, adenoviruses and retroviruses showed relatively poor transduction efficiency and rapid silencing in hMSCs (Bestor, 2000; Hung *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005; McMahon *et al.*, 2006). Nonetheless, all these viral vectors have very significant safety limitations (induction of cancer and strong immune reactions) (Marshall, 1999; Li *et al.*, 2002). Besides, they usually require high titres to be effective in hMSCs and they tend to be very complex compared with nonviral techniques (McMahon *et al.*, 2006).

A simpler method for hMSC transfection is DNA electrotransfer, where a pulsed electrical field is used to permeabilize the cell membrane and allow the entry of DNA into both dividing and nondividing cells.

Several reports have shown the feasibility of electrotransfer in hMSCs (Haleem-Smith *et al.*, 2005; Aluigi *et al.*, 2006), but with poor efficiency and/or use of specific electroporators, with preset programs and unique electropora-

tion buffers. The exact electrical parameters of the pulses and composition of electroporation buffer are therefore unknown to the scientist and as such very hard to optimize if needed.

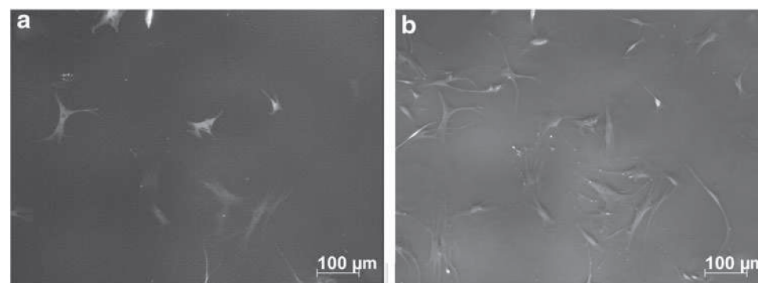
We previously optimized the EGT of rat MSCs using square-wave electric pulses and were able to achieve a transfection efficiency of up to 32% with up to 70% viability (Ferreira *et al.*, 2008). Our data show that the same electrical parameters can also be applied to the hMSCs, with similar results. However, a level of 32–40% of transfected cells can be insufficient for many applications.

Here we report several protocol improvements that resulted in a simple, reliable, and highly efficient electrotransfer protocol. Our transfection efficiencies are equal to the best viral transductions performed with hMSCs, without the complex, sensitive, and hazardous viral production and without safety concerns. Moreover, we use defined square-wave electric pulses ( $8 \times 1500$  V/cm, 100 µs, 1 Hz) and buffer (S-MEM with 40% H<sub>2</sub>O) that are not reliant on a specific electroporator or undisclosed commercial buffers, allowing for simple, cheap, and easy optimization. The protocol reported here is especially convenient for *in vitro* studies of stem cell function and fate. It can potentially be applied to any stem cell therapy that requires MSC transient transfection.

The experiments were actually performed to analyze three aspects of the protocols for MSC electrotransfer using square-wave pulses.

### Robustness of the electrotransfer procedure

The electrotransfer procedure using square-wave electric pulses is unaffected by donor variability. Indeed, for both the BM-MSCs and the AT-MSCs, a similar efficacy was achieved,



**FIG. 5.** Morphology and GFP expression of transfected cells at day six after thawing (71 days post-EGT). (a) Fluorescence image (GFP). (b) Phase-contrast image.



## ROBUST AND EFFICIENT DNA ELECTROTRANSFER IN HMSC

7

which was not donor dependent. Interestingly, this was demonstrated using the procedure previously reported for rat MSCs (Fig. 1a and b) as well as the improved protocol here developed (Fig. 1f–h). However, whatever the parameters used, BM-MSCs were very slightly better transfected than the AT-MSCs. Even though BM-MSCs and AT-MSCs are comparable in proliferation rate, clonogenicity, and differentiation potential, they differ significantly in abundance of CD146<sup>+</sup> fraction, level of VEGF, SDF-1, MCP1, and TGF $\beta$ 1 secretion. Moreover, BM-MSCs enter senescence earlier than AT-MSCs (Dmitrieva *et al.*, 2011). These small dissimilarities may result in small variations in the average cell size, membrane properties, or DNA level expression accounting for the small difference in electrotransfer efficiency observed.

The electrotransfer is affected by neither the delay between EGT and thawing nor the cell confluency before electrotransfer. The cells can be electrotransfected over a period of at least 7 days after their thawing without loss of their transfectability (Fig. 1c) and whatever the degree of confluence of the cell culture prior the electrotransfer (at least between 40% and 80% confluency; Fig. 1e).

*Efficacy of the electrotransfer procedure, through its improvement to achieve up to 95% electrotransfected cells*

The improved procedure is highly efficient: taking into account all the protocol parameter modifications, an average of about 80% (up to 95%) of GFP-positive MSCs was constantly achieved, with a high expression level of transgene and viability around 70%. The initial conditions used in this study were derived from our previous study with rat MSCs. The increase of the pulses field amplitude did not result in a higher level of electrotransfer efficacy (Fig. 1d). Therefore, with respect to the electrical parameters, we confirmed that the optimal transfection of the pCMV-GFP plasmid was obtained with application of a train of eight electric pulses (100  $\mu$ s) at field amplitude of 1500 V/cm and 1 Hz repetition frequency. The cells were incubated at room temperature before EGT, according to the previous optimization with the rat MSCs (Ferreira *et al.*, 2008). Final plasmid concentrations of 0.16 up to 1.04 mg/ml were used and we show that increase in transfection efficiency correlates with an increase in plasmid concentration. This is consistent with other studies (Helledie *et al.*, 2008; Cepurniene *et al.*, 2010). However, there is a maximal limit whereby the plasmid concentration can be used since it is technically difficult to pipette the highly concentrated stock solution of plasmid due to its viscosity.

The addition of water in the electropulzation buffer resulted in a further improvement of the transfection efficiency without affecting the viability of the cells. Our observation is in agreement with another study which showed that in Chinese hamster ovary cells, DNA electrotransfer is improved, without affecting the viability, when a hypotonic pulsing buffer (obtained by decreasing the sucrose concentration) is used before, during, and after the pulse (Golzio *et al.*, 1998). We confirmed this effect of the osmotic pressure in the case of the hMSCs, with a different buffer, since we observed that decreasing the osmolality (S-MEM  $\approx$  284 mmol/kg; S-MEM+40% H<sub>2</sub>O  $\approx$  134 mmol/kg) of the electrotransfection buffer improves the transfection efficiency. It has been reported that the osmotic pressure is not modifying the

electric field intensity needed to permeabilize the cells but is affecting the extent of permeabilization obtained once the permeabilization threshold has been reached (Golzio *et al.*, 1998). The increased permeabilization could be caused by the higher permeability of the membrane owing to the swollen forces. Once the cells are permeabilized by the electric pulses, the hypo-osmotic buffer induces a hydrodynamic influx of water during and after the pulse, which could carry the plasmid into the cytoplasm (Golzio *et al.*, 1998).

*Practicality and potential of the procedure, to facilitate the use of the electrotransfected MSCs*

Practicality of the procedure is very high, as almost no constraints exist with respect to the culture conditions of the cells before their electrotransfer. Indeed, since it may not be practical to transfect the MSCs on the day of their isolation, or immediately following thawing from cryopreservation, we examined if the delay between cells thawing and electrotransfer could affect the transfection efficiency. We showed that this delay had no significant effect on the transfection efficacy. Similarly, the degree of confluence of the MSC cell culture had no influence, thereby not imposing restrictions for the time to perform the electrotransfer.

In another respect, we were able to detect the transgene expression after up to 30 days of cell culture *in vitro*. Indeed, under our optimized conditions, even though global expression of the GFP reporter gene seems to rapidly start to fall, the percentage of transfected cells remained stable for a week and then decreased gradually. This is probably because of the relatively slow rate of MSC division. This stability in the number of transfected cells allows the use of an almost completely transfected cell population for several days, which is an impressive potential for a nonintegrative and nonviral gene transfer procedure. Proliferation experiments usually require transgene expression for only a few days, and most differentiation experiments for one to several weeks. Our protocol is therefore suitable for studies of the effect of a particular transgene on these stem cells. A transgene expression by almost all the cells without the need of a sorting step may also be essential for optimal *in vivo* therapeutic uses. In this case knowing that the expression will only be temporary would greatly increase the safety of the procedure for the patient. Furthermore, in some clinical applications such as regenerative medicine, the expression of the key genes activating the repair programs has to be transient. Transitory gene transfer technologies that temporally coordinate the behaviors of the different cell populations required for effective repair and/or regeneration would be more effective and safe. Clinical use of the induced pluripotent stem cells could also benefit from our optimized protocol. Indeed, to generate induced pluripotent stem cells, high transfection efficiency as well as transient expression (8–12 days) are mandatory (Stadtfield *et al.*, 2008). It is also interesting to note that these transfected MSCs maintain their transgene expression following cryopreservation. Therefore, our protocol offers the practical advantage of the ability of preparing the transfected MSCs and cryopreserving them as an on-the-shelf product.

Another very important aspect is the maintenance of the stem cell phenotype after electrotransfer. Indeed, the introduction of foreign DNA into mammalian cells can adversely affect cell phenotype, which for stem cells use would be a

major concern. This may be caused not only by the presence of the foreign DNA but also by the method of transfection. For example, adverse effects of some common lipofection reagents on both proliferation and multilineage differentiation of hMSCs have been reported (Helledie *et al.*, 2008). In the case of electrotransfer, the exposure to strong electric field affects membrane structure and could also negatively affect stem cell phenotype. The introduction of foreign DNA in stem cell is an essential tool for a better understanding of their function and for gene and stem cell therapy; it is therefore important to develop highly effective transfection methods with minimal adverse effects on stem cell phenotype. Very interestingly, in the present study neither electric pulses nor GFP overexpression had any effect on the MSC-specific stem cell surface antigens, potential for differentiation or proliferation, which is in agreement with other reports on electrotransfer in MSCs (Ferreira *et al.*, 2008; Helledie *et al.*, 2008).

### Conclusions

EGT remains the best method of gene transfer since it does not involve the introduction of potentially harmful foreign particles such as viruses. Square-wave electric pulses have already been proven safe and effective in their use in clinical settings. Here we have further optimized the EGT technique *in vitro*, resulting in a rapid and simple protocol, yielding high transfection efficiency for hMSCs (up to 95%), together with high expression level of transgene that can be sustained for up to a month *in vitro* while maintaining good viability (around 70%), adipogenic and osteogenic differential potential, and proliferation rates at levels comparable with untreated cells. Our revised protocol would be very convenient for the successful transfection of stem cells from a variety of sources as well as donors, and would only require minor and easy optimization. We have also demonstrated several practical potentialities of this approach that should be of great interest for its implementation in clinical protocols.

### Acknowledgments

This work was jointly funded by Science Foundation Ireland (SFI), Strategic Research Cluster (SRC) (Grant No. SFI: 09/SRC B1794), CNRS, and Ulysses Grant from the Irish Research Council for Science, Engineering and Technology in partnership with Teagasc, French Embassy, the French Foreign Ministry, and Égide. We also would like to acknowledge the funding support from ANR IPSIOAT (ANR-11-BS09-031-02) as well as INTCELL and MEMOVE. This research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory.

### Author Disclosure Statement

L.M.M. is a beneficiary of patents licensed for the use of the Cliniporator, produced by IGEA (Carpi, Italy). T.O.B. is a founder, director, and equity holder in Orbsen Therapeutics, Ltd. A.L., F.M.A., L.L.L., and M.-A.D.M. declared no competing financial interest.

### References

Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., *et al.* (2006). Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone

marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 454–461.

Andre, F.M., Gehl, J., Sersa, G., *et al.* (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum. Gene Ther.* 19, 1261–1271.

Barry, F.P., and Murphy, J.M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 568–584.

Bestor, T.H. (2000). Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J. Clin. Invest.* 105, 409–411.

Cepumiene, K., Ruzgys, P., Treinys, R., *et al.* (2010). Influence of plasmid concentration on DNA electrotransfer *in vitro* using high-voltage and low-voltage pulses. *J. Membr. Biol.* 236, 81–85.

Chan, J., O'Donoghue, K., de la Fuente, J., *et al.* (2005). Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells* 23, 93–102.

Dmitrieva, R.I., Minullina, I.R., Bilibina, A.A., *et al.* (2011). Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle* 11, 377–383.

Ferreira, E., Potier, E., Logeart-Avramoglou, D., *et al.* (2008). Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Ther.* 15, 537–544.

Golzio, M., Mora, M.P., Raynaud, C., *et al.* (1998). Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 74, 3015–3022.

Griffin, M., Greiser, U., Barry, F., *et al.* (2010). Genetically modified mesenchymal stem cells and their clinical potential in acute cardiovascular disease. *Discov. Med.* 9, 219–223.

Haleem-Smith, H., Derfoul, A., Okafor, C., *et al.* (2005). Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Mol. Biotechnol.* 30, 9–20.

Helledie, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2008). A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17, 837–848.

Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., *et al.* (2005). Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J. Gene Med.* 7, 718–728.

Hojman, P., Gissel, H., Andre, F.M., *et al.* (2008). Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Hum. Gene Ther.* 19, 1249–1260.

Hung, S.C., Lu, C.Y., Shyue, S.K., *et al.* (2004). Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Coxsackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22, 1321–1329.

Lee, M.J., Cho, S.S., Jang, H.S., *et al.* (2002). Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation. *Exp. Mol. Med.* 34, 265–272.

Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., *et al.* (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.

Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244–2245.

McMahon, J.M., Conroy, S., Lyons, M., *et al.* (2006). Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev.* 15, 87–96.

Mir, L.M. (2006). Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Eur. J. Cancer Suppl.* 4, 38–44.



# ROBUST AND EFFICIENT DNA ELECTROTRANSFER IN HMSC

9

- Mir, L.M., Morsli, N., Garbay, J.R., *et al.* (2003). Electrochemotherapy: a new treatment of solid tumors. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22, 145–148.
- Quaglino, P., Mortera, C., Osella-Abate, S., *et al.* (2008). Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 2215–2222.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230–240.
- Uchida, E., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., and Hayakawa, T. (2002). Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 891–897.

Address correspondence to:

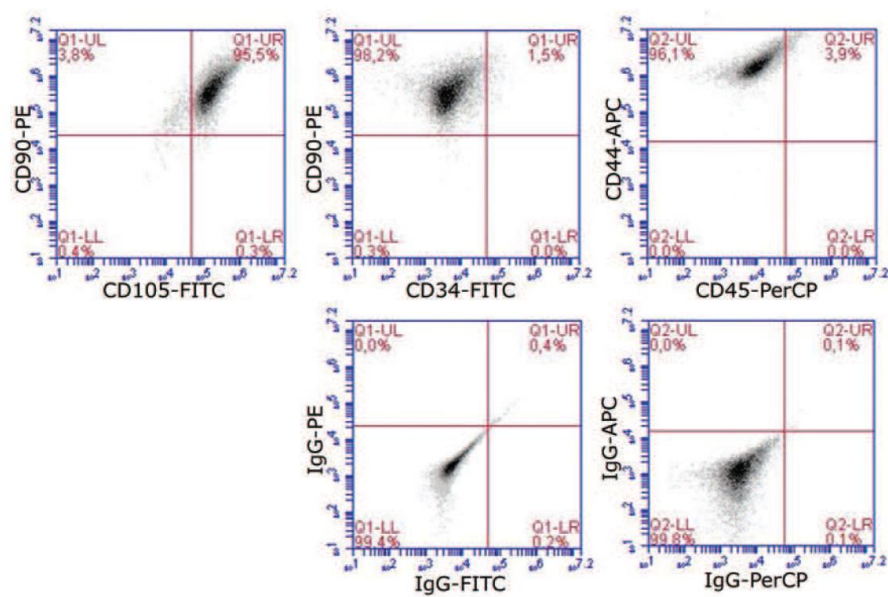
Dr. Franck M. André  
*Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses*  
 UMR 8203 CNRS, Univ Paris-Sud  
 Institut Gustave-Roussy  
 114 rue Edouard Vaillant  
 94805 Villejuif Cédex  
 France

E-mail: franckandre1@gmail.com

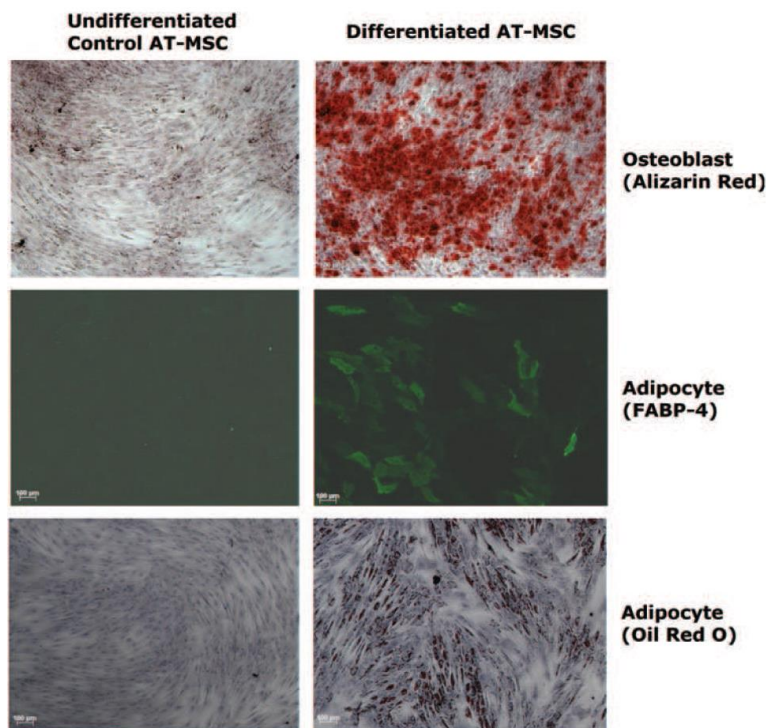
Received for publication August 9, 2012;  
 accepted after revision June 27, 2013.

Published online: August 9, 2013.

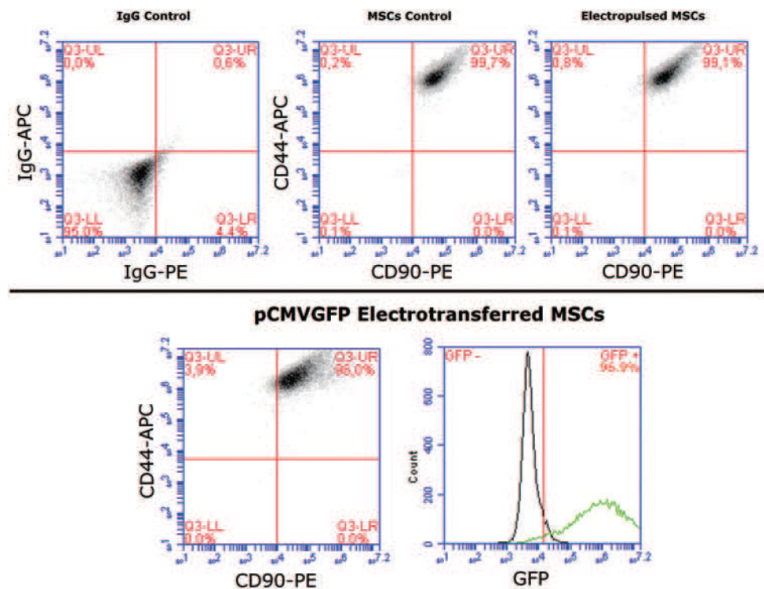
Supplementary Data



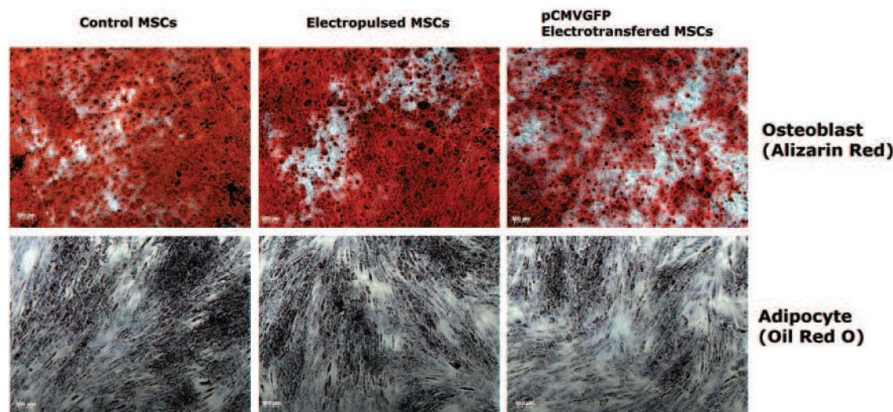
**SUPPLEMENTARY FIG. S1.** Analysis of MSC surface antigen marker expressions in human AT-MSCs by flow cytometry. Cell suspensions were stained with specific mouse antihuman monoclonal antibodies as indicated in density plots. AT-MSCs were positive for CD105 (95.8%), CD90 (99.5%), and CD44 (100%) and negative for CD34 (1.5%) and CD45 (3.9%). AT-MSCs, adipose tissue-derived MSCs; MSC, mesenchymal stem cell.



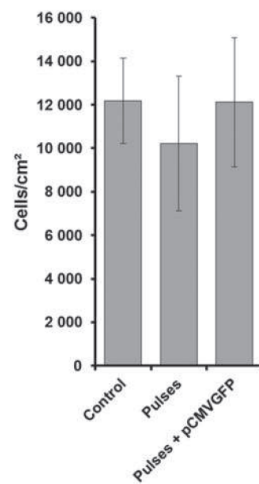
**SUPPLEMENTARY FIG. S2.** The adipogenic and osteogenic differentiation potential of AT-MSCs. AT-MSCs were cultured in adipogenic medium and osteogenic medium to induce differentiation, whereas undifferentiated control AT-MSCs were maintained in regular maintenance medium. Cells were fixed and stained with Oil Red O and FABP-4 antibody to detect lipid vacuoles, and Alizarin Red to detect accumulation of deposited calcium.



**SUPPLEMENTARY FIG. S3.** Analysis of MSC surface antigen marker expressions 7 days after electrotransfer with a pCMVGFP plasmid. GFP expression, CD44, and CD90 were analyzed by flow cytometry. Control MSCs, electropulsed MSCs, and pCMVGFP-electrotransfected MSCs maintain their stem cell surface antigen expression profile (CD44 and CD90) after a week in culture. MSCs stained with fluorochrome-conjugated nonspecific IgG were examined as a background control. The GFP plot shows the GFP expression in electrotransfected cells (in green) compared with mock-transfected control cells (in black), 7 days after electrotransfer with a pCMVGFP plasmid.



**SUPPLEMENTARY FIG. S4.** Adipogenic and osteogenic differentiation of control MSCs, electropulsed MSCs, or pCMVGFP-electrotransfected MSCs. After electric treatment, cells were allowed to differentiate under appropriate chemical stimulation into one of the two lineages. Cells were fixed and stained with Oil Red O to detect lipid vacuoles, and Alizarin Red to detect accumulation of deposited calcium. The visible accumulation of lipid droplets and the level of Oil Red O staining as well as the accumulation of calcium-containing mineral deposits in the extracellular matrix demonstrate maintenance of the MSC multidifferentiation potential after electroporation.



**SUPPLEMENTARY FIG. S5.** MSCs maintain their proliferation rate after electrotransfer. Four days after electrotransfection, cells were trypsinized, plated in 6-well plates at 30 cells/cm<sup>2</sup>, and cultured for 11 days. MSCs were then trypsinized, stained with Trypan Blue, and counted on Biorad TC20 Automated Cell Counter. The cell numbers of pcMVGFP-electrotransfected cells were compared with electropulsed MSCs and to nontransfected control cells.

#### **AUTHOR QUERY FOR HGTB-2012-159-VER9-LIEW\_1P**

- AU1: Please add postal code to affiliation 1.
- AU2: Please expand CNRS in affiliation 3.
- AU3: Please check the accuracy of all author affiliations.
- AU4: Please define S-MEM.
- AU5: Please check and confirm the address of correspondence.
- AU6: Please define S-MEM in the legend of Fig. 1.

## **Annexe 2**

### **Article 5 : Les impulsions électriques ultracourtes, de quelques nanosecondes : un outil pour manipuler l'intérieur des cellules et pour traiter les cellules cancéreuses**

De Ménorval MA, Mir LM

Revue 3EI

La revue 3EI est destinée aux professeurs ou industriels concernés par l'enseignement de l'électrotechnique et de l'électronique industrielle. Il a été demandé à une ancienne doctorante du laboratoire (le Dr. Aude Silve) de réaliser un dossier de plusieurs articles en français sur le thème de la biophysique et des effets des impulsions électriques sur les cellules et le vivant. J'ai donc pu participer à ce dossier en écrivant un article sur les impulsions électriques ultracourtes en insistant sur les aspects physiques. La version présentée ici n'est pas la version finale, il peut encore y avoir des modifications.

Dans cet article, différents types de générateurs permettant de générer des impulsions ultracourtes (de quelques nanosecondes à quelques centaines de nanosecondes) ont été détaillés. Plusieurs types de commutateurs pouvant être utilisés pour générer des impulsions électriques ultracourtes ont aussi été décrits dans cet article. Le choix du commutateur dépend des contraintes électriques à satisfaire (durée, fréquence et amplitude des impulsions désirées). Les impulsions électriques ultracourtes peuvent être utilisées *in vivo* et *in vitro* ce qui nécessite de travailler avec des systèmes d'exposition adaptés à ces applications. Les principaux types de systèmes d'exposition existant ont été rapportés dans cet article.

Une version antérieure de cet article a aussi été inséré dans le début de la partie III de l'introduction de cette thèse. Il permet de mieux situer le travail décrit dans le deuxième article de ma thèse (développement d'un système d'exposition pour les impulsions nanoseconde) et aussi de mieux situer les conditions expérimentales dans lesquelles j'ai réalisé le travail correspondant au troisième article de cette thèse (application d'impulsions nanoseconde de très forte amplitude de champ sur des cellules adhérentes).



# Les impulsions électriques ultracourtes, de quelques nanosecondes: un outil pour manipuler l'intérieur des cellules

MA. de MENORVAL<sup>1,2,3</sup>, A. SILVE<sup>4</sup>, L.M. MIR<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France-94805

<sup>2</sup>CNRS, Villejuif, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, France-94805

<sup>3</sup>Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, Villejuif, France-94805

<sup>4</sup>Institute for pulsed power and microwave technology, Karlsruhe Institute of Technology, Allemagne

**Résumé :** Durant les dix dernières années, le domaine de l'électroporéabilisation a connu un tournant majeur avec l'utilisation d'impulsions ultracourtes (quelques nanosecondes) et de très forte amplitude de champ (de l'ordre de la centaine de  $\text{MV.m}^{-1}$ ) : les impulsions nanoseconde. Ces impulsions électriques affectent la membrane plasmique mais elles ont surtout la particularité de toucher les sous compartiments cellulaires, ce qui n'était pas possible avec les impulsions de l'ordre de la milliseconde ou de la microseconde. Plusieurs technologies de circuits électriques produisant des champs électriques allant jusqu'à  $40 \text{ MV.m}^{-1}$  avec des commutations ultrarapides sont maintenant disponibles et utilisées par les biologistes. Les impulsions nanoseconde sont actuellement appliquées à la biologie cellulaire car elles représentent un nouvel outil pour micromanipuler l'intérieur des cellules et à la médecine car elles ont montré leur efficacité dans le traitement de tumeurs cancéreuses animales et humaines. Même si de nombreuses études sont encore à réaliser avant que ces impulsions ne soient utilisées en routine dans ces domaines, les impulsions nanoseconde présentent de très grandes potentialités pour l'avenir.

## 1. Introduction

Jusqu'à la fin des années 90, les impulsions électriques utilisées en biologie pour déstabiliser la membrane cellulaire étaient des impulsions d'une durée de quelques centaines de microsecondes à quelques millisecondes et d'une amplitude de champ d'une dizaine de  $\text{kV.m}^{-1}$  à quelques centaines de  $\text{kV.m}^{-1}$ . Les impulsions de quelques dizaines de  $\text{kV.m}^{-1}$  et celles d'amplitude supérieure permettent de perméabiliser la membrane des cellules des êtres vivants pour y faire entrer des molécules à visée thérapeutique telles que des médicaments ou de l'ADN (voir l'article sur les applications médicales par Calvet, et Mir dans ce numéro). Ce procédé est appelé électroporéabilisation. Depuis le début des années 2000, de nouvelles impulsions électriques plus courtes et d'amplitudes plus élevées ont été utilisées en biologie : les impulsions dites nanoseconde. Ces impulsions ont une durée de quelques nanosecondes à quelques centaines de nanosecondes et une amplitude de champ pouvant atteindre  $40 \text{ MV.m}^{-1}$ . Dans le cas des impulsions milliseconde et microseconde, la membrane plasmique se comporte comme un isolant ce qui n'est plus vrai dans le cas des impulsions nanoseconde. Les impulsions nanoseconde sont plus courtes que le temps de charge de la membrane plasmique qui ne se comporte plus comme un isolant. Par conséquent, les impulsions nanoseconde ont la particularité de pouvoir se propager à l'intérieur des cellules et d'affecter les structures cellulaires internes contrairement aux impulsions microseconde ou milliseconde qui n'affectent que la membrane externe des cellules.

## 2. Les organites intracellulaires.

### 2.1. Aspect biologique

L'intérieur de la cellule est appelé cytoplasme et il se compose du cytosol et des organites. Les organites sont des sous compartiments cellulaires. Ils sont isolés du cytosol par une ou deux membranes phospholipidiques. Les différents organites ont des structures et des rôles spécialisés (**Figure 1**). Les organites principaux sont la mitochondrie, le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

#### • La mitochondrie

C'est le lieu de la respiration cellulaire où l'énergie apportée par l'alimentation est transformée en énergie utilisable par la cellule sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate). La mitochondrie est un organite entouré par deux membranes (enveloppe). L'espace inter membranaire contient des molécules telles que Bcl-2 ou le cytochrome c qui sont impliquées dans la mort cellulaire programmée (c'est l'apoptose, un mécanisme parfois décrit comme un suicide cellulaire) lorsqu'elles sont libérées dans le cytoplasme suite à un stimulus approprié.

#### • Le noyau

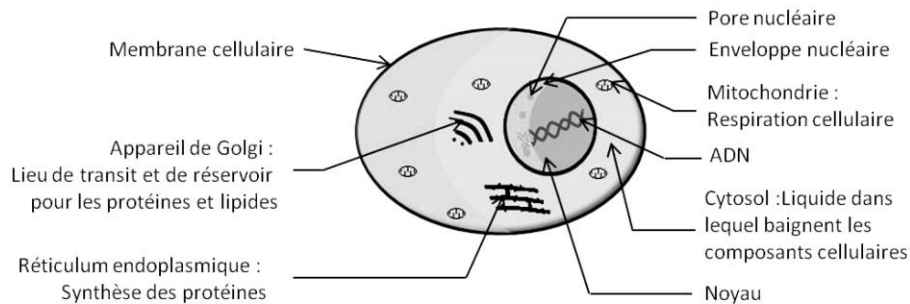
C'est l'organite qui contient l'ADN et donc l'information génétique de la cellule. Le noyau est aussi un organite à enveloppe. Cependant, l'enveloppe nucléaire a la particularité d'être composée de deux membranes, d'une armature interne de protéines (les lamines), le tout étant traversé par des pores nucléaires.

- **Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi**

Ce sont des organites à simple membrane. Le réticulum endoplasmique est impliqué dans la synthèse des protéines et des lipides ainsi que dans le stockage du calcium intracellulaire. L'appareil de Golgi sert de lieu de transit pour les protéines et les lipides synthétisés dans le réticulum endoplasmique. L'appareil de Golgi a un rôle essentiel dans l'élaboration des protéines.

Toutes les membranes cellulaires sont des filtres sélectifs qui ne laissent passer que certaines molécules. La sélectivité de ces filtres dépend de la composition de la membrane. Plus précisément, cette sélectivité dépend de la composition en lipides de la membrane,

puisque'ils peuvent laisser passer certaines molécules par diffusion simple (surtout les petites molécules non chargées), et de la composition en protéines de la membrane, puisqu'elles peuvent agir comme des transporteurs pour des ions et pour des molécules plus grosses chargées ou non. Or, toutes les membranes ne sont pas identiques. En effet, il existe une variabilité dans la composition des membranes d'un type cellulaire à un autre ou d'un organisme à un autre. De plus, il existe aussi des différences entre les membranes de différents organites au sein de la même cellule. Par conséquent, les molécules pouvant traverser les membranes diffèrent en fonction du type de membrane (membrane de mitochondrie, membrane plasmique, etc), du type cellulaire et de l'organisme dont est issue la cellule.

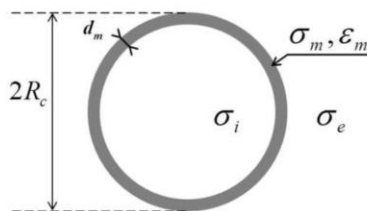


**Figure 1 :** Une cellule et ses principaux composants intra-cellulaire.

## 2.2. Modélisation électrique

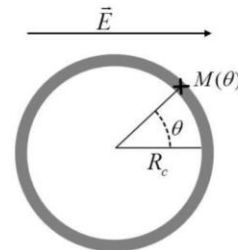
La complexité et la diversité des organites intracellulaires laissent entrevoir avec un peu d'imagination, les possibilités qui s'ouvrent en biologie et en médecine si l'on est capable de les manipuler. Du point de vue de la modélisation électrique, il est évident qu'il est extrêmement difficile de décrire très précisément la réalité biologique. Il est cependant possible d'évaluer par des modèles simples l'effet d'un champ électrique sur un organite intracellulaire.

Considérons une cellule sphérique de rayon  $R_c$ . Sa membrane d'épaisseur  $d_m$  possède une conductivité  $\sigma_m$  et une permittivité relative  $\epsilon_m$ . Les milieux intérieurs et extérieurs sont caractérisés par leur conductivités respectives  $\sigma_i$  et  $\sigma_e$  (**Figure 2**).



**Figure 2 :** Paramètres électriques et géométriques d'une cellule

Lorsqu'on applique à l'extérieur de la cellule un champ électrique constant  $E$  homogène et unidirectionnel, il s'établit en chaque point de la membrane  $M(\theta)$  une différence de potentiel  $V_m(t, \theta)$ . L'angle  $\theta$  est défini par l'angle entre la normale à la membrane au point considéré et la direction du champ électrique.



**Figure 3 :** Cellule dans un champ électrique.

L'expression analytique de  $V_m(t, \theta)$  est donnée par l'équation (1) (cette expression est considérée comme acquise mais elle est justifiée dans l'article de Poignard et Silve dans ce numéro)

$$V_m(t, \theta) = \frac{3}{2} R_c E \cos(\theta) [1 - \exp(-t/\tau_m)] \quad (1)$$

La constante de charge  $\tau_m$  est explicitée en fonction des paramètres électriques de la cellule dans l'équation (2) :



$$\tau_m = \left( \frac{1}{2\sigma_e} + \frac{1}{\sigma_i} \right) \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m}{d_m} R_c \quad (2)$$

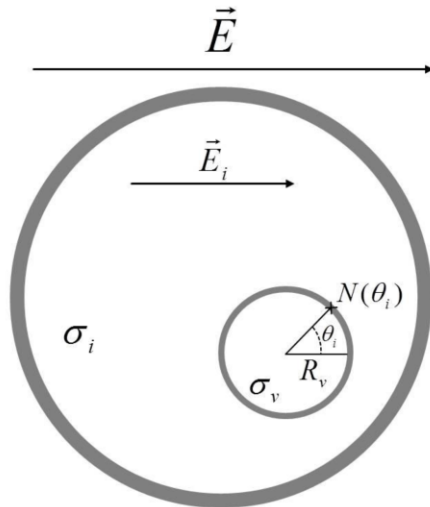
Si l'on exprime l'équation (1) dans le domaine de Fourier, on obtient l'équation (3), où  $j$  est le nombre complexe racine de -1 ( $j^2 = -1$ ) et  $\omega$  [rad.s<sup>-1</sup>] est la pulsation considérée ( $\omega = 2\pi f$  avec  $f$  [Hz] la fréquence).

$$V_m(\omega, \theta) = \frac{3}{2} R_c \cos(\theta) \frac{E}{1 + j\omega\tau_m} \quad (3)$$

De même, il est possible d'exprimer le champ  $E_i$  à l'intérieur de la cellule. Si l'on considère un milieu intra-cellulaire homogène alors le champ  $E_i$  est en première approximation homogène et son expression dans le domaine de Fourier est donnée par l'équation (4). La direction du champ est identique à celle du champ extérieur (de même ceci est justifié dans l'article de *Poignard et Silve*).

$$E_i(\omega) = \frac{3\sigma_e}{\sigma_c + 2\sigma_e} \frac{j\omega\tau_m}{1 + j\omega\tau_m} E \quad (4)$$

La **Figure 4** montre une cellule contenant une vésicule intra-cellulaire sphérique de rayon  $R_v$ . La vésicule est soumise au champ  $E_i$ , le champ à l'intérieur de la cellule. Sa membrane possède les mêmes propriétés électriques que la membrane extérieure de la cellule. La vésicule baigne dans le milieu intracellulaire de conductivité  $\sigma_i$ . On note  $\sigma_v$  la conductivité à l'intérieur de la vésicule.



**Figure 4** : Cellule contenant une vésicule intracellulaire.

Pour cette vésicule, on peut écrire la tension transmembranaire  $V_v(\theta_i, \omega)$  qui s'établit en tout point  $N(\theta_i)$  de sa membrane. Pour cela, on utilise la même équation que pour la tension transmembranaire établie sur la membrane extérieure de la cellule mais en remplaçant les paramètres électriques et géométriques

par ceux de la vésicule et en considérant que le champ extérieur est  $E_i$  (équation 5).

$$V_v(\omega, \theta_i) = \frac{3}{2} R_v \cos(\theta_i) \frac{E_i(\omega)}{1 + j\omega\tau_v} \quad (5)$$

La constante de temps  $\tau_v$  représente le temps caractéristique de charge de la membrane de la vésicule. Elle s'exprime en fonction des paramètres électriques et géométriques de la vésicule en transposant l'équation 2 :

$$\tau_v = \left( \frac{1}{2\sigma_i} + \frac{1}{\sigma_v} \right) \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m}{d_m} R_v \quad (6)$$

L'équation 7, donne l'expression de la tension transmembranaire qui s'établit en tout point de la membrane de la vésicule en fonction du champ extérieur.

$$V_v(\omega, \theta_i) = \left( \frac{3}{2} \right)^2 R_v \frac{3\sigma_e}{\sigma_c + 2\sigma_e} \times \cos(\theta_i) \frac{1}{1 + j\omega\tau_v} \frac{j\omega\tau_m}{1 + j\omega\tau_m} E(\omega) \quad (7)$$

Les valeurs typiques des différents paramètres électriques et géométriques du problème sont détaillées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1** : paramètres électriques et géométriques de la cellule et de la vésicule

$\sigma_e$	1.5 S/m
$\sigma_i$	1 S/m
$\sigma_v$	1 S/m
$\varepsilon_m$	8
$d_m$	5 nm
$R_c$	10 $\mu$ m
$R_v$	1 $\mu$ m

En utilisant les paramètres du **Tableau 1**, on obtient pour les constantes de charges de la cellule  $\tau_m$  et de la vésicule  $\tau_v$  :

$$\begin{aligned} \tau_c &\approx 200 \text{ ns} \\ \tau_v &\approx 20 \text{ ns} \end{aligned}$$

La constante de temps de la vésicule est donc environ 10 fois plus faible que celle de la membrane externe. Ceci est dû à sa plus petite taille. L'ordre de grandeur de la constante de temps pour la membrane externe est de 200 ns. Les impulsions de quelques nanosecondes ou quelques dizaines de nanosecondes sont donc trop courtes pour atteindre le régime stationnaire.

#### • Interprétation dans le domaine fréquentiel

Dans la suite de l'article seuls les pôles de la cellule et de la vésicule sont considérés. Ainsi,  $\theta = \theta_i = 0[\pi]$ .

Il est possible de définir les fonctions de transfert  $FT_c(\omega)$  – respectivement  $FT_v(\omega)$  – donnant les relations entre la tension sur la membrane externe – respectivement sur la membrane de la vésicule – et le

champ extérieur (il est important de remarquer que ces fonctions de transfert ne sont pas adimensionnées).

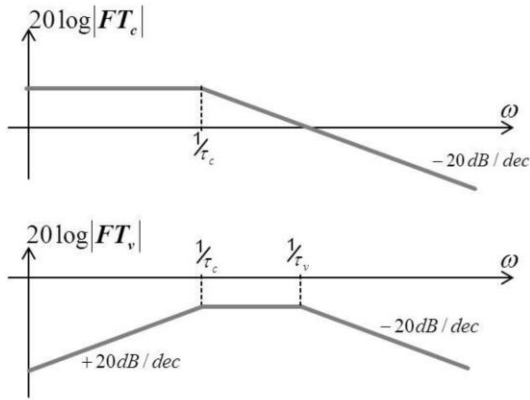
$$FT_c(\omega) = \frac{V_m(\omega)}{E(\omega)} \quad FT_v(\omega) = \frac{V_v(\omega)}{E(\omega)}$$

Les expressions développées des deux fonctions de transfert sont données par les équations 8 et 9. Leurs comportements asymptotiques en amplitude sont représentés dans les diagrammes de Bode de la **Figure 5**.

$$FT_c(\omega) = \frac{3}{2} R_c \frac{1}{1 + j\omega\tau_c} \quad (8)$$

$$FT_v(\omega) = \left(\frac{3}{2}\right)^2 R_v \frac{1}{1 + j\omega\tau_v} \frac{j\omega\tau_c}{1 + j\omega\tau_c} \quad (9)$$

La première fonction de transfert,  $FT_c(\omega)$ , est celle d'un filtre passe-bas. Ce comportement vient du fait que la membrane se comporte comme un condensateur. A haute fréquence ( $f \gg 2\pi/\tau_c$ ), elle devient équivalente à un court circuit et donc ne se charge plus. La seconde fonction de transfert,  $FT_v(\omega)$ , est celle d'un filtre passe-bande. Les hautes fréquences ( $f \gg 2\pi/\tau_v$ ) sont coupées par la membrane de la vésicule. De plus les basses fréquences ( $f \ll 2\pi/\tau_c$ ) sont écartées par la membrane extérieure de la cellule.



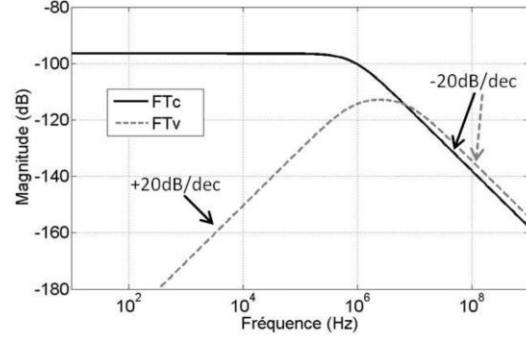
**Figure 5 :** Comportement asymptotique en amplitude des fonctions de transfert  $FT_c(\omega)$  et  $FT_v(\omega)$  dans un diagramme de Bode en échelle log sur l'axe x

Les fonctions de transfert calculées à partir des grandeurs typiques du tableau 1 sont tracées sur la **Figure 6**. Elles présentent les mêmes comportements asymptotiques décrits plus haut. De plus, la fréquence pour laquelle  $FT_v$  passe par un maximum peut être évaluée. Avec les paramètres choisis, cette fréquence est de l'ordre de 2.5 MHz.

#### • Conséquences dans le domaine temporel

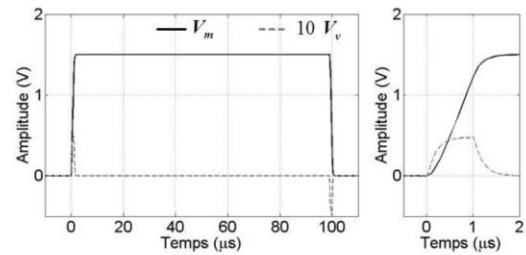
A l'aide des fonctions de transfert, il est possible d'étudier la réponse des membranes lorsqu'un champ extérieur impulsionnel  $E$  est appliqué. Dans un premier

temps, l'impulsion considérée est une impulsion de 100  $\mu s$  avec des fronts de montée et de descente de 1  $\mu s$  et une amplitude de 100  $kV.m^{-1}$  (impulsion classique en électroporation). Les tensions  $V_m$  et  $V_c$  calculées grâce aux fonctions de transfert sont représentées sur la **Figure 7**.



**Figure 6 :** Représentation dans le diagramme de Bode du module des fonctions de transfert  $FT_c(\omega)$  et  $FT_v(\omega)$ .

La membrane de la cellule se charge en moins d'une microseconde puis reste à une valeur constante. La dynamique de la charge est imposé d'une part par le comportement exponentiel (équation 1) et d'autre part par la dynamique de l'impulsion qui n'est pas un échelon parfait puisque le temps de montée est de 1  $\mu s$ . A la fin de l'impulsion, la membrane se décharge avec une dynamique identique à celle de la charge. La membrane de la vésicule se comporte très différemment. Pendant les fronts de montée et de descente de l'impulsion, la tension sur sa membrane décrit respectivement un pic positif et un pic négatif. La membrane de la vésicule ne reste donc pas chargée, elle se décharge après environ 1  $\mu s$  c'est-à-dire dès la fin du front de montée). Sa valeur maximale reste faible (environ 50 mV dans cet exemple).

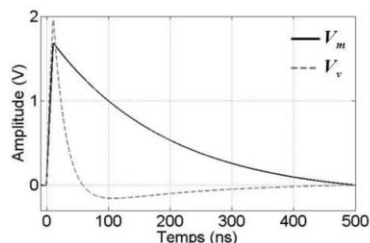


**Figure 7 :** Simulation des tensions sur la membrane plasmique ( $V_m$ ) et sur la membrane de la vésicule ( $V_v$ ) lors d'une impulsion de champ électrique de 100  $\mu s$  (1  $\mu s$  de fronts de montée et de descente) et 100  $kV.m^{-1}$ . La tension  $V_v$  a été multipliée par 10. La figure de droite est un zoom temporel en début d'impulsion. L'impulsion est appliquée au temps  $t=0$ .

Dans le cas d'une impulsion ultracourte, la dynamique des deux tensions de membrane est tout autre. La **Figure 8**, montre les simulations de  $V_m$  et  $V_c$  lors de



l'application d'une impulsion de 10 ns, de fronts de montée et de descente de 1 ns et d'amplitude  $10 \text{ MV.m}^{-1}$ . Les deux tensions augmentent pendant toute la durée de l'impulsion mais cette fois le régime permanent n'est pas atteint. Ensuite, les deux tensions se relaxent pendant un temps bien plus long que la durée de l'impulsion. Par ailleurs, les deux tensions atteignent des valeurs similaires, autour de 1.5 V dans cet exemple.



**Figure 8 :** Simulation des tensions sur la membrane plasmique ( $V_m$ ) et sur la membrane de la vésicule ( $V_v$ ) lors d'une impulsion de champ électrique de 10 ns (1 ns de front de montée et de descente) et  $10 \text{ MV.m}^{-1}$  d'amplitude. L'impulsion est appliquée au temps  $t=0$ .

Dans les exemples ci-dessus, les amplitudes des impulsions sont de  $100 \text{ kV.m}^{-1}$  dans le cas de l'impulsion de 100  $\mu\text{s}$  et de  $10 \text{ MV.m}^{-1}$  pour l'impulsion de 10 ns. Dans le premier cas, les  $100 \text{ kV.m}^{-1}$  suffisent à induire plus de 1 V sur la membrane plasmique. Pour l'impulsion de 10 ns, bien que l'amplitude de champ soit beaucoup plus élevée, les tensions  $V_m$  et  $V_v$  atteignent également à leur maximum 1 à 2 V. Ainsi pour espérer voir des effets biologiques avec des impulsions ultracourtes il est nécessaire d'augmenter considérablement les amplitudes de champ. C'est ce que l'on observe expérimentalement. On peut enfin noter, que les impulsions nanoseconde ne sont pas a priori spécifiques aux organites intracellulaires. La membrane plasmique, dans la mesure où elle se charge à des valeurs de l'ordre du volt sera certainement affectée également.

#### • Limites du modèle

Il est important de souligner que ces résultats proviennent d'un modèle parfaitement linéaire. En réalité si un phénomène d'électroporation se produit, la conductivité de la membrane augmente fortement et de façon non-linéaire avec la tension sur la membrane. Ceci se traduira par un feed-back sur les tensions  $V_m$  et  $V_v$  et donc par une déviation des valeurs de ces deux tensions par rapport aux valeurs calculées avec cette approche linéaire.

Il est évident que le modèle présenté ici est une simplification de la réalité, en particulier du point de vue de la géométrie du problème. Par ailleurs les conductivités des différents milieux ont été considérées comme homogènes ce qui constitue également une forte approximation. Enfin, les permittivités des

milieux intra et extra cellulaires ont été négligées bien qu'elles commencent à intervenir aux fréquences considérées (voir l'article *Poignard et Silve* dans ce numéro). Malgré tout, cette approche permet de bien comprendre pourquoi les impulsions courtes sont susceptibles d'affecter l'intérieur des cellules. Une validation du modèle nécessiterait des expériences permettant de mesurer les tensions induites sur les organelles intracellulaires mais aucune à ce jour n'a pu être mise en œuvre dans un tel but. En revanche, de nombreuses expériences sont développées afin de mettre en évidence les effets biologiques intracellulaires.

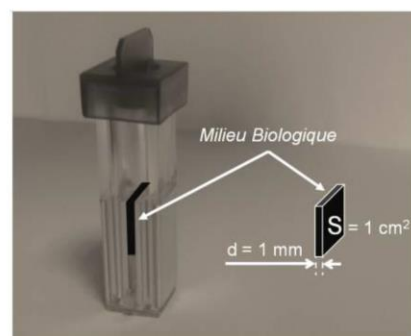
### 3. Expériences visant à mettre en évidence des effets intracellulaires : aspects techniques

Cette section vise à illustrer les difficultés technologiques qui se présentent lorsque l'on souhaite réaliser des expériences sur cellules biologiques avec des impulsions nanoseconde et des forts niveaux de champs.

#### 3.1. Que signifie exposer un objet biologique ?

Lorsque l'on parle d'exposer une cellule à un champ électrique, il faut comprendre que l'on expose la cellule dans son environnement c'est-à-dire dans un milieu biologique. Suivant le type d'expérience biologique que l'on souhaite réaliser, on va par ailleurs préférer exposer une cellule unique ou un ensemble de cellules.

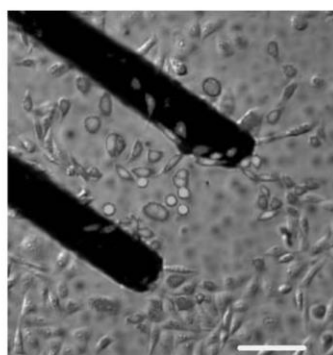
Un des dispositifs les plus répandu pour l'exposition de cellules à des impulsions électriques est la cuvette d'électroporation. Il s'agit d'une cuvette en plastique avec deux plaques métalliques parallèles entre lesquelles on peut placer une solution contenant les cellules en suspension (typiquement 100  $\mu\text{L}$  de solution contenant  $10^5$  cellules). Ce sont des dispositifs commerciaux qui existent avec des espaces inter-électrodes constants de 1 mm, 2 mm ou 4 mm (une cuvette 1 mm est présentée sur la **Figure 9**). Les électrodes des cuvettes sont en aluminium dont la surface est polie pour limiter la création d'arcs électriques.



**Figure 9 :** Cuvette d'électroporation classique de distance inter-électrodes 1 mm.

Ce système d'exposition présente l'avantage de permettre de travailler en conditions stériles. Cela permet donc de récupérer les cellules après l'application des impulsions électriques et de les suivre dans le temps pour comprendre l'effet à moyen et à long terme de ces impulsions. Cependant, il n'est pas possible d'observer les cellules au microscope pendant l'application du champ électrique et pendant la minute qui suit. Par ailleurs, lorsqu'elles sont remplies d'une solution biologique, ces cuvettes présentent une impédance complexe (au sens mathématique de partie réelle et partie imaginaire) ce qui empêche de satisfaire l'adaptation d'impédance avec les générateurs ce qui rend par conséquent plus complexe la maîtrise des impulsions appliquées [1].

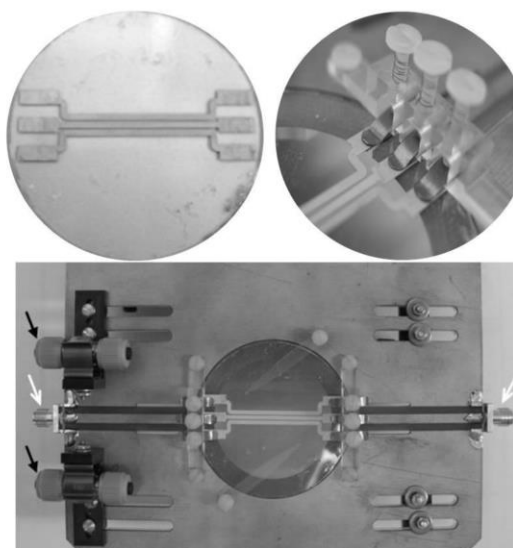
Lorsque l'on souhaite observer les cellules au microscope pendant ou juste après l'exposition, il est possible de déposer les cellules sur une lame de verre et de venir approcher ensuite deux électrodes de chaque côté. La **Figure 10** montre un exemple d'une telle réalisation (d'après [2]). Les électrodes sont des fils de tungstène de 0,125 mm de diamètre séparée par 0,310 mm. Elles sont positionnées grâce à un micromanipulateur qui permet de contrôler leur position au micron près. Un avantage majeur de cette configuration est que l'impédance présentée par l'échantillon biologique entre les deux électrodes est en générale élevée (de l'ordre du k $\Omega$ ). L'adaptation d'impédance peut donc se faire simplement en ajoutant la résistance adéquate en parallèle. De plus, les électrodes étant très rapprochées, il est possible d'obtenir de fortes valeurs de champ avec des tensions raisonnables.



**Figure 10 :** Dispositif de micro-aiguilles. Deux électrodes constituées de fil de tungstène de 0,125 mm de diamètre et espacées de 0,310 mm sont disposées de part et d'autre des cellules à exposer. La barre d'échelle est de 100  $\mu\text{m}$ . (photo aimablement fournie par A. Pakhomov)

Les microdispositifs constituent une autre option qui permet d'allier certains avantages des cuvettes et des électrodes à aiguilles puisqu'ils permettent de traiter un plus grand nombre de cellules qu'entre les électrodes à aiguilles tout en permettant une observation simultanée des cellules au microscope. Comme les électrodes à aiguilles, les microdispositifs sont développés par des équipes de recherche [3]. La **Figure 11** présente un tel

système composé de trois électrodes planaires d'or de 25  $\mu\text{m}$  déposées par électrodépôt sur un substrat en quartz. Les électrodes définissent deux canaux de 150 ou 300  $\mu\text{m}$  (selon les modèles) dans lesquels on peut déposer les cellules. La miniaturisation permet encore de rapprocher les électrodes de manière à augmenter le champ électrique auquel est exposé l'échantillon. La conception de ce dispositif est basée sur les lignes de transmission, avec la contrainte de présenter une impédance caractéristique proche de 50  $\Omega$  lorsqu'il est rempli d'un milieu biologique classique (ce dispositif est détaillé dans la publication [3]).



**Figure 11 :** Haut gauche : microdispositif pour l'application d'impulsions nanoseconde basé sur l'architecture ligne de transmission. Haut droite, zoom sur la connectique permettant d'alimenter le dispositif. Bas : microdispositif dans son support. Les connecteurs SMA permettant de relier au circuit extérieur sont indiqués par les flèches blanches. Les flèches noires indiquent les connecteurs pour le circuit microfluidique. D'après [3].

La plupart des dispositifs étant fabriqués à façon par chaque équipe de recherche, différents types de matériaux peuvent être utilisés pour les électrodes comme par exemple le tungstène, l'acier inoxydable, le platine, l'or, etc... Le matériau utilisé pour les électrodes doit cependant être choisi avec soin. En effet, il est fréquent d'avoir un relargage de particules dans la solution à l'interface entre les électrodes et l'échantillon suite à l'application du champ électrique [4]–[6]. Il faut donc éviter les matériaux qui rejettent des particules toxiques ou des particules qui peuvent interférer avec les systèmes biologiques. On peut noter que lorsque le cuivre est exposé à des impulsions électriques, il peut relarguer des ions cuivre qui ont un effet toxique sur les cellules. L'or ou le platine sont des matériaux qui ne présentent pas de toxicité cellulaire induite par la solubilisation d'ions métalliques mais leur coût est bien supérieur à celui du cuivre.



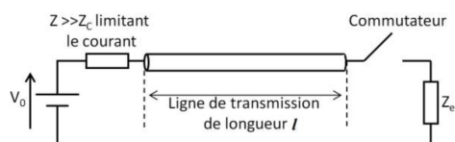
### 3.2. Les générateurs d'impulsions nanoseconde.

Afin de mener les expériences biologiques, il est nécessaire de pouvoir appliquer des impulsions ultracourtes (nanosecondes) avec des niveaux de champs de l'ordre de  $10 \text{ MV.m}^{-1}$ . Les dimensions standard des échantillons en biologie sont généralement de l'ordre du mm (parfois du cm lorsque l'on conduit des expériences *in vivo*). Les tensions requises sont donc typiquement de l'ordre de 10 kV.

La génération de telles impulsions nécessite un stockage de l'énergie électrique pour permettre une libération très rapide de cette énergie dans le dispositif d'exposition de l'échantillon. Le stockage peut être fait soit par un système inductif, soit par un système capacitif. Le stockage inductif permet une gestion précise du courant alors que le stockage capacitif permet de mieux maîtriser la tension. Par ailleurs, les stockages inductifs sont le plus souvent couplés à des commutateurs à ouverture [7], [8] alors que les stockages capacitifs se font avec des commutateurs à fermeture qui offrent plus de degrés de liberté et une mise en œuvre moins délicate. C'est pour ces différentes raisons que les générateurs à impulsions nanoseconde utilisent essentiellement le stockage capacitif. Les dispositifs les plus classiques sont les générateurs à ligne de transmission, les générateurs de Marx et les générateurs Blumlein. La **Figure 12** illustre le schéma de principe d'un générateur à ligne de transmission. La ligne de transmission est chargée avec une tension  $V_0$  puis à la fermeture du commutateur il y a libération d'une impulsion rectangulaire d'amplitude  $V_0/2$  si l'impédance de l'échantillon  $Z_e$  est la même que l'impédance caractéristique de la ligne de transmission  $Z_c$  [9]. Le plus souvent, les lignes de transmission utilisées sont des câbles coaxiaux. La durée  $D$  de l'impulsion est déterminée par la longueur  $l$  de la ligne de transmission et s'exprime :

$$D = 2\tau = \frac{2l\sqrt{\epsilon_r}}{c}$$

où  $\tau$  est le temps de propagation dans la ligne de transmission,  $\epsilon_r$  est la permittivité relative du diélectrique utilisé dans la ligne de transmission et  $c$  est la vitesse de la lumière dans le vide. A titre d'exemple, un câble coaxial de 1 m dont l'isolant est en polyéthylène (permittivité relative  $\epsilon_r = 2.25$ ) produira une impulsion de 10 ns.



**Figure 12 :** Schéma électrique d'un générateur d'impulsion à ligne de transmission.  $Z$  correspond à l'impédance de la source de tension continue et  $Z_e$  correspond à l'impédance de l'échantillon.

Le principe de fonctionnement détaillé des différents générateurs n'est pas exposé dans cet article mais le lecteur intéressé pourra se référer au livre suivant [10]. Dans tous ces dispositifs, les commutateurs sont souvent les éléments critiques car ils gouvernent en grande partie la forme de l'impulsion (ils fixent en particulier le plus court temps de montée que l'on peut obtenir) ainsi que la fréquence de répétition. Un certain nombre de générateurs utilisent des commutateurs dits « solides ». Il s'agit de semi-conducteurs (type MOSFET ou IGBT) ou de photoconducteurs (composants optoélectroniques dont les propriétés isolantes peuvent changer si le composant est exposé à un signal lumineux intense de type laser [11], [12]). Les autres commutateurs sont dits « liquides » ou « gazeux » [13]. Ils sont aussi appelés éclateurs. Il s'agit de deux électrodes séparées par un gaz ou un liquide, qui joue le rôle d'isolant jusqu'à ce que sa tension de claquage soit atteinte et que le courant passe, ce qui correspond à la fermeture de l'interrupteur (un exemple d'éclateur est détaillé dans l'article sur les applications industrielles dans ce numéro). Ces commutateurs ont comme avantage de supporter des tensions élevées. Ils sont couramment employés pour commuter des tensions de plusieurs centaines de kV. Par ailleurs ce type de commutateurs se détériore moins que les semi-conducteurs qui peuvent subir des claquages irréversibles qui altèrent les propriétés des jonctions de ces composants.

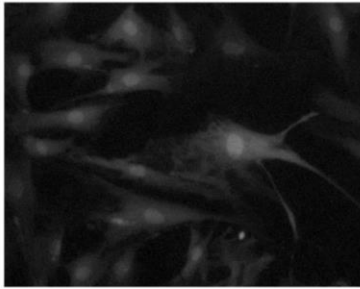
### 4. Exemples d'effets intracellulaires observés.

Il a été montré que les impulsions nanoseconde permettent de perméabiliser les mitochondries *in vitro* [14] et *in vivo* [15] et d'entraîner la mort cellulaire programmée (apoptose). Des effets des impulsions nanoseconde ont aussi été rapportés sur l'ADN contenu dans le noyau [16], [17].

La perméabilisation du réticulum endoplasmique a été aussi étudiée par plusieurs équipes. Par ailleurs, le réticulum endoplasmique représente un stock important de calcium dans la cellule (le calcium est mille fois plus concentré dans le réticulum endoplasmique que dans le cytosol). Il est donc possible de créer des pics de calcium dans le cytosol en réponse à l'application d'impulsions nanoseconde qui perméabilisent le réticulum endoplasmique.

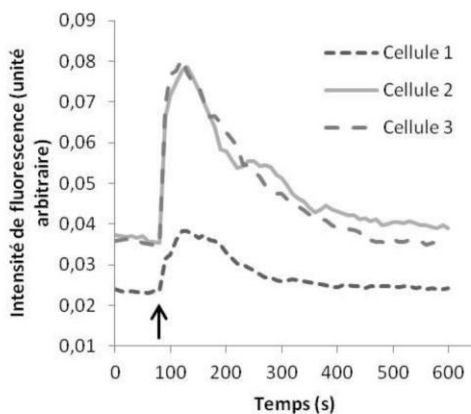
Il est possible de visualiser les pics de calcium dans le cytosol grâce à des molécules fluorescentes tels que le Fluo-4 qui ont la propriété d'être d'avantage fluorescentes lorsque la concentration de calcium augmente (**Figure 13** : Cellules contenant la molécule Fluo-4 sensible à la concentration de calcium. Les cellules apparaissent lumineuses car elles contiennent du calcium.. Il est ensuite possible de traiter les images pour obtenir les profils du pic de calcium dans les cellules en fonction du temps. Une telle expérience est présentée sur la **Figure 14**. Il est possible de voir l'augmentation de la fluorescence suite à l'application

d'une seule impulsion de 10 nanosecondes et de  $28\text{MV.m}^{-1}$ .



**Figure 13 :** Cellules contenant la molécule Fluo-4 sensible à la concentration de calcium. Les cellules apparaissent lumineuses car elles contiennent du calcium.

Le calcium est un ion primordial dans le fonctionnement de la cellule et il est impliqué dans différents mécanismes cellulaires comme la prolifération, la migration, la différenciation ou la fécondation. Il pourrait donc être possible de perturber ces mécanismes cellulaires grâce à l'application d'impulsions nanoseconde.



**Figure 14 :** Génération d'un pic du calcium dans des cellules suite à l'application d'une seule impulsion de 10 ns et de  $28\text{MV.m}^{-1}$ . Les cellules contiennent une molécule fluorescente dont la fluorescence augmente avec la concentration de calcium (Fluo-4). La flèche correspond au moment où l'impulsion nanoseconde a été délivrée.

Il a aussi été montré que les impulsions nanoseconde permettent de perméabiliser la membrane plasmique [18], [19] comme les impulsions microseconde ou milliseconde. L'action des impulsions nanoseconde n'est donc pas spécifique aux organites intracellulaires. D'autres effets sur la membrane plasmique tel que l'externalisation des phosphatidylsérines (PS) ont également été observés immédiatement après l'application d'impulsions nanoseconde [20]. Les PS sont des lipides que l'on retrouve dans la membrane

plasmique mais très majoritairement dans le feuillet interne. Lorsque les membranes sont exposées à des champs électriques tels que les impulsions nanoseconde, il est possible qu'un réarrangement local de la membrane se produise et qu'il y ait translocation de parties du feuillet interne de la membrane plasmique vers l'extérieur.

Enfin, différentes études montrent qu'il est possible d'utiliser les impulsions nanoseconde pour traiter des tumeurs chez l'animal et l'homme *in vitro* et *in vivo*. En effet, il est possible de faire réduire, voire de faire disparaître, des tumeurs de cancer de la peau chez la souris en utilisant un grand nombre d'impulsions nanoseconde (entre quelques centaines et quelques milliers d'impulsions) [15], [21]. Cette technique présente l'avantage de ne pas laisser de cicatrice.

Différents types de cellules cancéreuses humaines ont aussi été exposées *in vitro* à des impulsions nanoseconde entraînant une forte réduction de la viabilité de ces cellules [21], [22]. A ce jour, il n'existe cependant qu'un cas où des impulsions nanoseconde ont été appliquées *in vivo* sur un patient humain et où le traitement a conduit à une rémission complète de la tumeur traitée [22]. Ces recherches sont donc encore à un stade très précoce.

## 5. Conclusion

Le développement de générateurs à impulsions nanoseconde a été un enjeu technique durant les dix dernières années mais il est maintenant possible d'étudier l'effet d'impulsions très courtes (quelques nanosecondes) et d'amplitude de champ très élevée (quelques  $\text{MV.m}^{-1}$  à quelques dizaines de  $\text{MV.m}^{-1}$ ) sur les cellules ou les tissus *in vitro* ou *in vivo*.

Ces impulsions, dont la durée est plus courte que le temps de charge des membranes plasmiques des cellules, permettent d'affecter les membranes des organites cellulaires. Les impulsions nanoseconde affectent aussi la membrane plasmique des cellules.

Pour finir, le potentiel thérapeutique des impulsions nanoseconde a été prouvé *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux et humains. Cependant, il y a une grande disparité dans les traitements appliqués (nombre d'impulsions, amplitude, durée des impulsions, fréquence) et il reste encore à valider l'innocuité et l'efficacité de ce type de traitement dans le cadre d'essais précliniques et cliniques définissant les paramètres optimaux à utiliser selon les types de tumeurs.

## 6. Références

- [1] A. Silve, R. Vezinet, and L. M. Mir, "Nanosecond-Duration Electric Pulse Delivery In Vitro and In Vivo: Experimental Considerations," *Instrum. Meas. IEEE Trans.*, vol. PP, no. 99, pp. 1–10, 2012.



- [2] A. G. Pakhomov, J. F. Kolb, J. A. White, R. P. Joshi, S. Xiao, and K. H. Schoenbach, "Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF)," *Bioelectromagnetics*, vol. 28, no. 8, pp. 655–663, Dec. 2007.
- [3] C. Dalmay, M. A. De Menorval, O. Français, L. M. Mir, and B. Le Pioufle, "A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells," *Lab. Chip*, vol. 12, no. 22, pp. 4709–4715, Nov. 2012.
- [4] T. Tomov and I. Tsoneva, "Are the stainless steel electrodes inert?," *Bioelectrochemistry*, vol. 51, no. 2, pp. 207–209, Jun. 2000.
- [5] R. Stapulionis, "Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation," *Bioelectrochemistry Bioenerg. Lausanne Switz.*, vol. 48, no. 1, pp. 249–254, Feb. 1999.
- [6] J. W. Loomis-Hussellbee, P. J. Cullen, R. F. Irvine, and A. P. Dawson, "Electroporation can cause artefacts due to solubilization of cations from the electrode plates. Aluminum ions enhance conversion of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate into inositol 1,4,5-trisphosphate in electroporated L1210 cells," *Biochem. J.*, vol. 277 ( Pt 3), pp. 883–885, Aug. 1991.
- [7] A. V. Nazarenko, P. S. Antsiferov, L. A. Dorokhin, K. N. Koshelev, and Y. V. Sidel'nikov, "A Driver of Rapidly Rising Current Pulses Based on a Semiconductor Opening Switch," *Instruments Exp. Tech.*, vol. 46, no. 1, pp. 54–56, Jan. 2003.
- [8] A. N. Panchenko and V. F. Tarasenko, "Efficient gas lasers pumped by double-discharge circuits with semiconductor opening switch," *Prog. Quantum Electron.*, vol. 36, no. 1, pp. 143–193, Jan. 2012.
- [9] P. W. Smith, *Transient Electronics: Pulsed Circuit Technology*. John Wiley & Sons, 2002.
- [10] *Pulsed Power Systems - Principles and Applications*.
- [11] S. El-Amari, A. De Angelis, D. Arnaud-Cormos, V. Couderc, and P. Leveque, "Characterization of a Linear Photoconductive Switch Used in Nanosecond Pulsed Electric Field Generator," *IEEE Photonics Technol. Lett.*, vol. 23, no. 11, pp. 673–675, 2011.
- [12] S. El-Amari, M. Kanaan, C. Merla, B. Vergne, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, and V. Couderc, "Kilovolt, Nanosecond, and Picosecond Electric Pulse Shaping by Using Optoelectronic Switching," *IEEE Photonics Technol. Lett.*, vol. 22, no. 21, pp. 1577–1579, 2010.
- [13] J. Bac, "Contribution à l'étude et à la réalisation de commutateurs et de générateurs haute tension transitoires," Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2005.
- [14] P. T. Vernier, "Mitochondrial membrane permeabilization with nanosecond electric pulses," *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Conf.*, vol. 2011, pp. 743–745, 2011.
- [15] R. Nuccitelli, X. Chen, A. G. Pakhomov, W. H. Baldwin, S. Sheikh, J. L. Pomier, W. Ren, C. Osgood, R. J. Swanson, J. F. Kolb, S. J. Beebe, and K. H. Schoenbach, "A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence," *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 125, no. 2, pp. 438–445, Jul. 2009.
- [16] S. Romeo, L. Zeni, M. Sarti, A. Sannino, M. R. Scarfi, P. T. Vernier, and O. Zeni, "DNA Electrophoretic Migration Patterns Change after Exposure of Jurkat Cells to a Single Intense Nanosecond Electric Pulse," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, p. e28419, Dezember 2011.
- [17] M. Stacey, J. Stickley, P. Fox, V. Statler, K. Schoenbach, S. J. Beebe, and S. Buescher, "Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis," *Mutat. Res.*, vol. 542, no. 1–2, pp. 65–75, Dec. 2003.
- [18] A. Silve, I. Leray, and L. M. Mir, "Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10ns electric pulse," *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, Oct. 2011.
- [19] A. M. Bowman, O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, and A. G. Pakhomov, "Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of Tl(+) uptake," *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 15–26, Jul. 2010.
- [20] P. T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, S. Salemi, C. M. Craft, and M. A. Gundersen, "Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 310, no. 2, pp. 286–295, Oct. 2003.
- [21] D. Yin, W. G. Yang, J. Weissberg, C. B. Goff, W. Chen, Y. Kuwayama, A. Leiter, H. Xing, A. Meixel, D. Gaut, F. Kirkbir, D. Sawcer, P. T. Vernier, J. W. Said, M. A. Gundersen, and H. P. Koeffler, "Cutaneous papilloma and squamous cell carcinoma therapy utilizing nanosecond pulsed electric fields (nsPEF)," *PloS One*, vol. 7, no. 8, p. e43891, 2012.
- [22] E. B. Garon, D. Sawcer, P. T. Vernier, T. Tang, Y. Sun, L. Marcu, M. A. Gundersen, and H. P. Koeffler, "In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies," *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 121, no. 3, pp. 675–682, Aug. 2007.

## **Annexe 3**

### **Manuel d'utilisation du dispositif développé dans le cadre de l'ANR NanoPulseBioChip. Protocole appliqué à l'étude des profils calciques.**

Au cours de ma thèse, j'ai été impliquée dans le développement d'un dispositif d'exposition aux impulsions nanosecondes dans le cadre d'une ANR (ANR-08-NANO-024 NanoPulseBioChip) regroupant 4 équipes de recherche (ONERA, ENS Cachan UMR 8029, CNRS X-LIM UMR 7252 et CNRS IGR UMR 8203). Une partie de ce dispositif a été détaillée dans l'article 2 de cette thèse et il a aussi été utilisé dans l'article 3.

Ce manuel a été rédigé à l'intention des personnes du laboratoire qui auront à utiliser ce dispositif ainsi qu'à celles qui voudront utiliser le protocole d'analyse des profils calciques que j'ai développé avec l'aide de Franck André.

Ce manuel est découpé en plusieurs parties qui détaillent :

- le protocole de préparation des cellules pour pouvoir utiliser un marqueur fluorescent du calcium, le Fluo-4 AM en association avec ce dispositif,
- le montage du dispositif,
- les réglages du montage électrique (nanopulseur et générateur de basses fréquences),
- les réglages nécessaires à l'observation au microscope,
- le démontage du système,
- Analyse des données et le tracé des courbes des profils calciques.



# Manuel d'utilisation du dispositif NanoPulseBioChip

Marie-Amélie de Ménorval

Franck André

Septembre 2013

UMR 8203

## Table des matières

- I. Préparation des cellules (dans le cas des MSC)**
  - A. Qualité des cellules
  - B. Etalement des cellules
  - C. Marquage des cellules
- II. Préparation du dispositif NanopulseBioChip**
  - A. Enlever la platine du microscope
  - B. Installer le bras du dispositif
  - C. Connexion du dispositif au boîtier des contrôleurs micrométriques en x et en y
  - D. Installer le support en cuivre avec la biopuce
- III. Réglage du nanopulseur FID et du GBF**
  - A. Branchements
  - B. Réglage du GBF
  - C. Test de fonctionnement
  - D. Remarques
- IV. Observation au microscope (optimisation pour les MSC)**
  - A. Réglages
- V. Démontage du dispositif**
- VI. Changement de puce**
- VII. Analyse des images**
  - A. Exporter les images
  - B. Détourage des noyaux
- VIII. Analyse des données et tracé des courbes**
  - A. Sous Grapher
  - B. Sous Matlab en utilisant le programme d'analyse de fréquences par transformée de Fourier sous Matlab

## **I. Préparation des cellules (dans le cas des MSC)**

### **A. Qualité des cellules :**

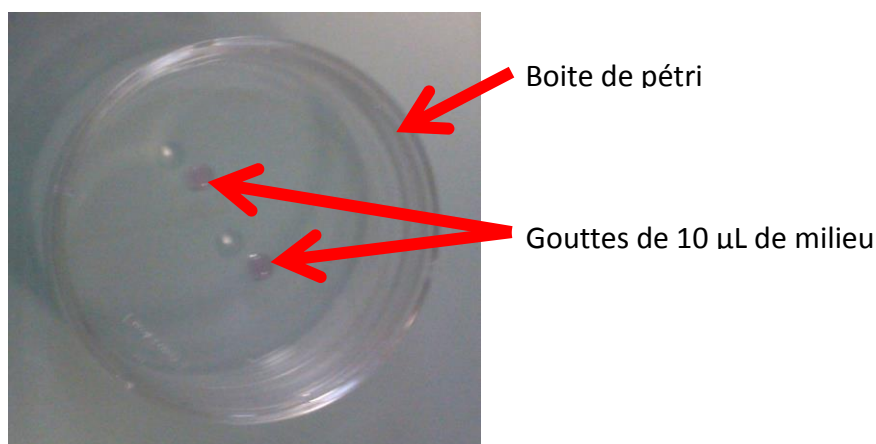
Travailler avec des cellules MSC âgées de moins de 10 passages, au-delà elles perdent progressivement leur multipotence.

Eviter la confluence car certaines cellules commencent alors à se différencier spontanément en os (forme longiligne).

### **B. Etalement des cellules :**

Utiliser des lamelles stériles 10x32 mm ou 16x35 mm selon la puce utilisée (il faut que toute la partie parallèle du canal soit recouverte par la lamelle et s'il y a un emplacement défini dans la couche de SU8 de la puce il faut que la lamelle rentre dedans). Pour stériliser les lamelles, il faut travailler sous la hotte et les laisser tremper quelques minutes dans une boîte de pétri avec de l'éthanol à 70% en vérifiant qu'elles ne se superposent pas. Aspirer l'alcool et grâce à une pince stérile (elle aussi désinfectée à l'alcool) placez les lamelles sur les bords de la boîte de pétri (avec un angle d'environ 45°C) et les laisser sécher (15 min). Quand elles sont sèches, les mettre dans une boîte de pétri que l'on n'ouvrira que sous la hotte).

Prendre une boîte de pétri 6 cm et disposer 2 gouttes de 10  $\mu$ L de milieu dedans (Figure 60). Grâce à une pince stérile prélever deux lamelles stériles et les poser sur les gouttes pour favoriser l'accroche. Rajouter par-dessus 150 000 cellules par boîte de 6 cm de diamètre. S'en servir au minimum 4 heures après.



**Figure 60 : gouttes de milieu dans la boîte de pétri**

## **C. Marquage des cellules :**

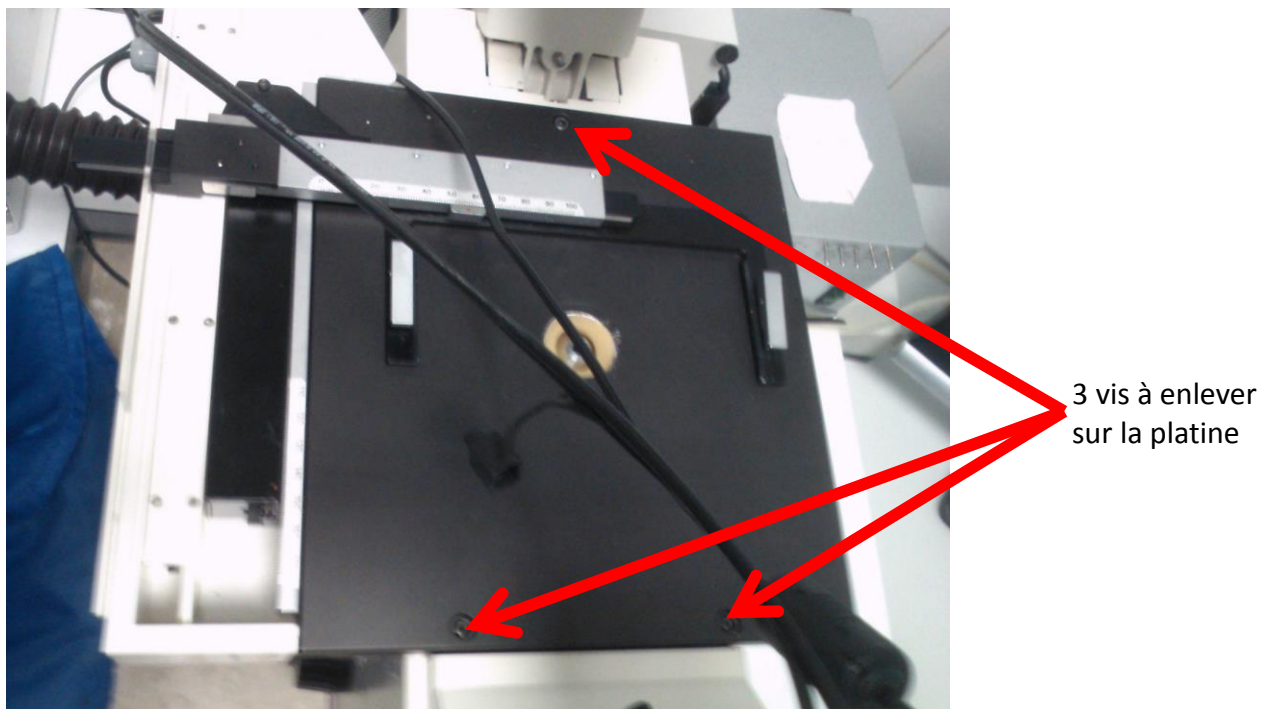
Avec une aiguille recourbée et une pince stérile prélever l'une des deux lamelles de la boîte de pétri et la mettre dans une Lab-Tek à une seul compartiment pour incuber les lamelles (10x32 et 16x35) dans moins de milieu. Rajouter 2mL de DMEM complet avec 10µL de Fluo4-AM (1mM) et 10µl de Hoechst 33342 (40µg/ml) (Fluo4-AM à 5µM final et Hoechst 33342 à 0.2µg/ml ou 375 nM) pendant 30min dans le noir, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Faire trois lavages au PBS et remettre la lamelle en DMEM ou en S-MEM (selon l'expérience à faire par la suite)

## **II. Préparation du dispositif NanopulseBioChip :**

A préparer pendant le temps d'incubation des cellules.

### **A. Enlever la platine du microscope**

Lever le haut du microscope (partie avec le condenseur) vers l'arrière. Enlever les trois vis de la platine du microscope (Figure 61) **(les ranger dans une boîte pour ne pas les perdre).**



**Figure 61 : platine du microscope de la salle de culture avec les flèches indiquant les vis à enlever pour la démonter**

**Attention : lorsque l'on dévisse la platine il faut la soutenir car elle peut pencher vers le côté où les vis sont encore en place.**

Mettre la platine sur le côté gauche du microscope entre celui-ci et le contrôleur du CO<sub>2</sub> **en faisant attention de ne pas tirer sur les fils et de ne pas abimer le tuyau en plastique**

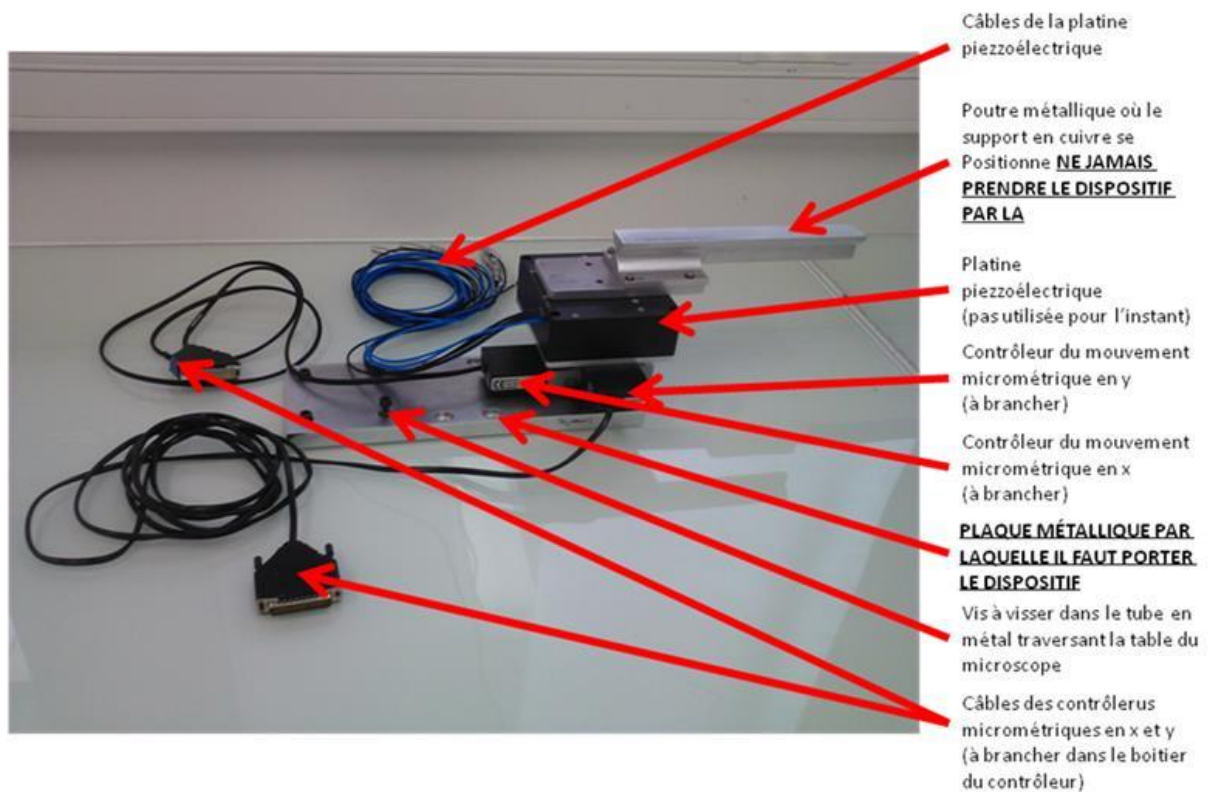
non plus. Absolument baisser les objectifs du microscope pour être sûr de ne pas les toucher en montant le bras

## **B. Installer le bras du dispositif**

Mettre le bras sur le microscope : **PARTIE A FAIRE**

### **OBLIGATOIREMENT A DEUX**

L'un prend le bras en tenant la plaque métallique du dessous (Figure 62). Ne jamais prendre par les blocs noirs ni la poutre du dessus au risque d'endommager les contrôleurs des mouvements en X, Y et la platines piézo-électrique. L'autre le suit en tenant tous les câbles.



**Figure 62 : bras du dispositif à placer sur le microscope**

Le premier dispose les vis du bras au-dessus de la barre métallique qui traverse la table du microscope et soutient le tout.



Trous à aligner avec les vis du bras

**Figure 63 : barre métallique traversant la table du microscope**

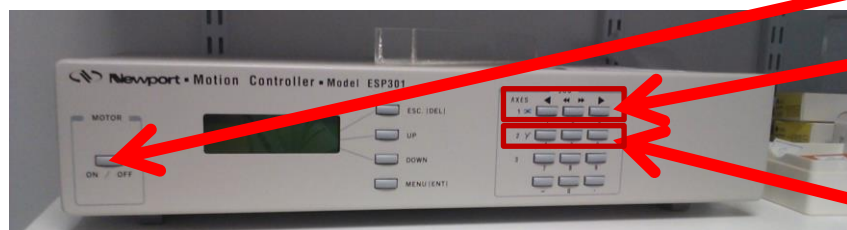
Le deuxième visse les vis **sans forcer (sinon les pas de vis risquent d'être abîmés).**

### **C. Connexion du dispositif au boîtier des contrôleurs micrométriques en x et en y**

Lorsque le bras est bien fixé, brancher les deux câbles venant des deux boîtiers noirs les plus en bas au boîtier beige sur l'étagère à gauche de la pièce. Les brancher dans les deux prises les plus à droite en branchant bien le câble avec le scotch bleu dans la prise avec le scotch bleu (Figure 64 B.).

A

B



Bouton ON/OFF  
Bouton permettant de bouger le dispositif dans l'axe x

Bouton permettant de bouger le dispositif dans l'axe y



Prise pour brancher le câble du contrôleur en x (avec le scotch bleu)

Prise pour brancher le câble du contrôleur en y (PAS de scotch bleu)

Bouton ON/OFF

**Figure 64 : boîtier du contrôleur pour les mouvements micrométriques en x et en y. A. vue de devant. B. vue de derrière**

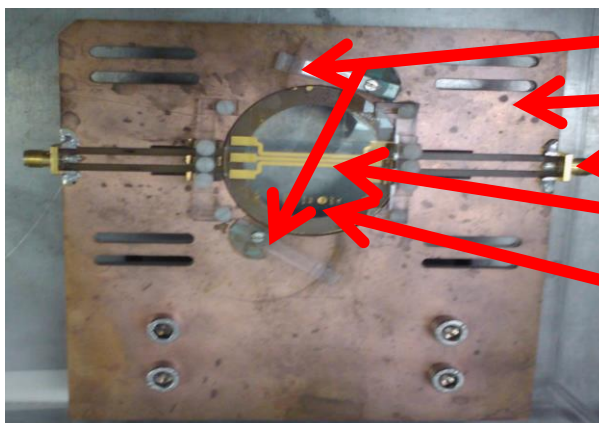
Allumer le bouton ON/OFF derrière le boîtier des contrôleurs. Laisser le programme se lancer puis appuyer sur le bouton ON/OFF de la face avant (bouton en bas à gauche) pour activer les deux voies (voie x et voie y). Utiliser les boutons de la face avant (Figure 64 A) pour faire bouger le dispositif dans l'axe des x ou des y. Le bouton de droite permet d'aller à droite à vitesse réduite, celui de gauche permet d'aller à gauche à vitesse réduite et si l'un des deux boutons est enfoncé avec le bouton du milieu, cela permet de bouger à vitesse maximale.

N.B. : avant de commencer l'expérience, faire bouger le bras à l'aide des contrôleurs vers les positions extrêmes pour vérifier que ça ne touche pas le microscope (ce qui pourrait arriver si quelqu'un avait déplacé le microscope) car cela endommagerait le dispositif.

## **D. Installer le support en cuivre avec la biopuce**

Quand les câbles sont branchés installer le support en cuivre sur le dispositif. **NE**

**JAMAIS FORCER.**



Pattes en plexiglas

Support en cuivre

Connecteur SMA

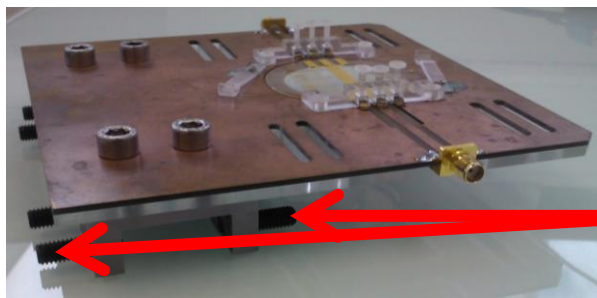
Electrodes parallèles en or

Biopuce en quartz

**Figure 65 : vue du dessus de support en cuivre avec la biopuce montée dessus**



Visser les petites vis sous le support sur la poutre en métal pour fixer le support (Figure 66).



Vis à visser sur la poutre

**Figure 66 : vue de côté du support pour visualiser les vis à visser**

Disposer 200  $\mu$ L de milieu sur les électrodes avec un cône en plastique sans racler les électrodes (**attention très fragile**) et de manière à couvrir les électrodes avec du milieu (à choisir selon la manip à faire) sur toute la longueur. **Les bulles dans le canal entre les électrodes constituent l'ennemi de cette expérience...** Toujours avec une pince prendre la lamelle avec les cellules marquées et la disposer sur la puce en mettant les cellules dans le canal (rotation de 180° par rapport à la position de la lamelle dans la Lab-Tek). Disposer les petites pattes en plexiglas (Figure 65) sur la lamelle pour que cette dernière soit en contact direct avec les électrodes. **Attention les cellules en dehors du canal sont surement écrasées lorsque la lamelle est aplatie sur les électrodes. NE PAS REPOSITIONNER LA LAMELLE APRES L'AVOIR PLAQUÉE AUX ÉLECTRODES.** Les seules cellules avec lesquelles il faut travailler sont celles entre les électrodes donc il ne faut pas faire glisser la lamelle sur la puce une fois que les pattes en plexiglas ont été mises car sinon on risque de travailler sur des cellules endommagées.

### III. **Réglage du nanopulseur FID et du GBF**

#### A. **Branchements**

Du FID part un gros coaxial noir connecté à l'extracteur BARTH (Figure 67) (40 dB donc atténuation de la tension d'un facteur 100). Une série d'atténuateurs est connectée à l'extracteur (3dB puis 2x 10 dB puis 20 dB). Il y a donc 83 dB d'atténuation en tout.

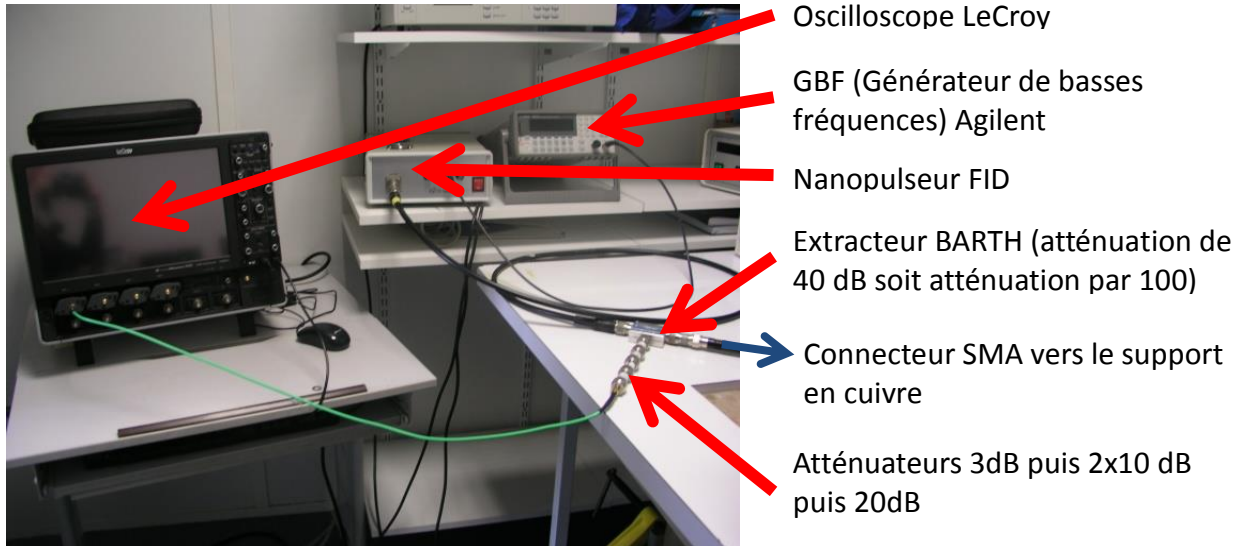
**ATTENTION IL NE FAUT JAMAIS ENVOYER PLUS DE 2V DANS L'OSCILLOSCOPE** en mode 50 $\Omega$  (utilisation la plus classique avec le FID).

N.B. : L'atténuateur avec l'atténuation la plus faible doit être mis le plus près de l'extracteur BARTH et celui qui atténue le plus doit être mis le plus loin (c'est pour éviter que les atténuateurs ne chauffent trop puisqu'une partie de l'énergie est dissipée en énergie



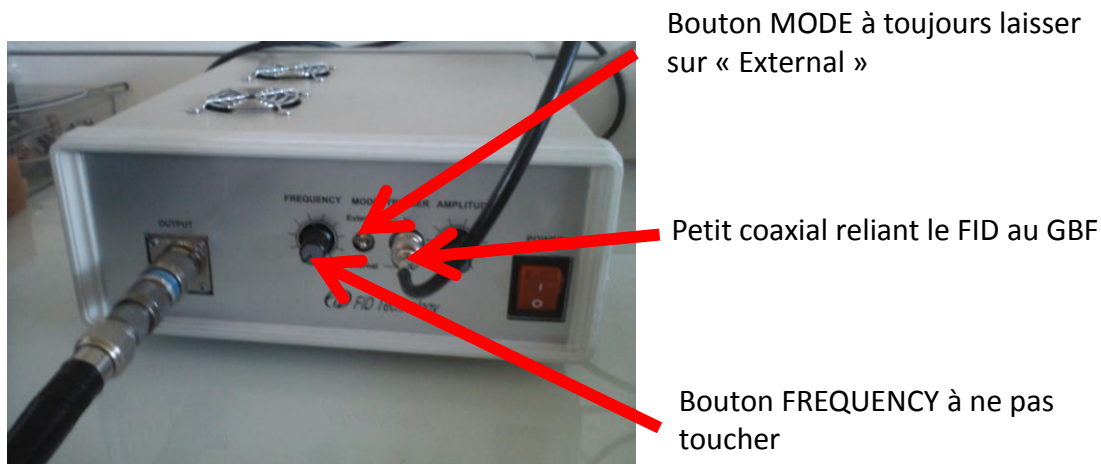
thermique donc quand il y a une forte atténuation sur une grande tension c'est là que ça chauffe le plus).

Les atténuateurs sont connectés à un câble SMA qui va dans l'oscilloscope LeCroy. L'autre extrémité de l'extracteur est connectée au support en cuivre par l'un des connecteurs SMA (On ne le branche que d'un côté et il faut vérifier que c'est le côté où les petites lamelles de cuivre sont bien mises pour connecter ce côté à la puce).



**Figure 67 : montage électrique**

Un petit câble coaxial relie la sortie Trigger du FID au GBF (sortie output). Le bouton MODE du FID doit toujours être sur « external » pour qu'il soit déclenché par le GBF (Figure 68).



**Figure 68 : Le nanopulseur FID**

Allumer l'oscilloscope LeCroy, le GBF Agilent et le nanopulseur FID.

## **B. Réglage du GBF**

A l'allumage du GBF le bouton SIN est allumé. Cliquer sur PULSE (Figure 69 A.). Puis appuyer deux fois sur le bouton sous Amp/High Level pour que High Level soit sélectionné et

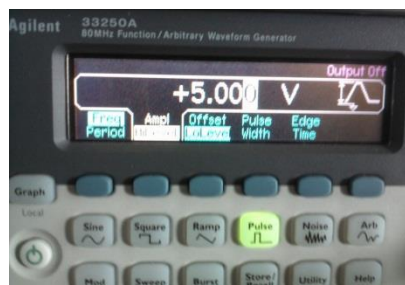
entrer 5 V (Figure 69 B.). Puis appuyer sur le bouton sous Offset/Low Level pour sélectionner Low Level et régler à 0 V (Figure 69 C.). Presser BURST puis TRIGGER PUIS OUTPUT (Figure 69 D.). Jusque là aucun pulse n'était délivré. A partir de ce moment-là à chaque fois que le bouton TRIGGER sera pressé le GBF déclenchera le FID.

A

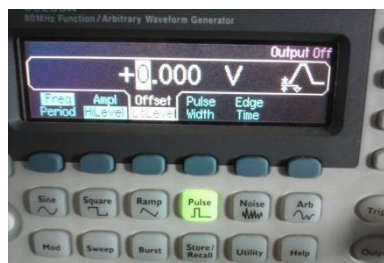


Petit coaxial reliant le GBF au FID

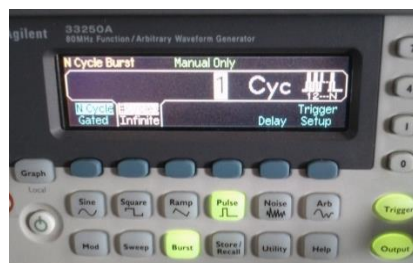
B



C



D



**Figure 69 : Réglage du GBF. A. Réglage de la forme du signal. B. Réglage du niveau maximal du signal. C. Réglage du minimum du signal. D. Passage en mode « burst » et réglage du déclenchement**

## **C. Test de fonctionnement**

Toujours faire un test avec une lamelle sans cellules et du milieu pour vérifier que le montage est OK et pour régler l'amplitude du pulse si besoin. Déposer 200  $\mu$ L de milieu en déposant quelques gouttes sur la largeur du canal et les faire se regrouper pour que toute la longueur de piste parallèle soit recouverte. **Attention de ne pas toucher les pistes avec le cône de la pipette pour ne pas endommager les pistes.**

## **D. Remarques**

Le bouton d'amplitude du FID ne doit jamais dépasser l'horizontale à droite (2 crans avant le maximum) lorsque l'extracteur BARTH est connecté derrière car il ne supporte pas la tension maximale du FID.

Des atténuateurs haute tension (Figure 70) peuvent être ajoutés à la sortie du FID pour diminuer la tension délivrée par le FID (3 dB, 8 dB, 10 dB et 26 dB).



**Figure 70 : atténuateurs haute tension (8dB et 26 dB)**

L'oscilloscope doit toujours être éteint puis débranché après la fin des expériences (pour éviter qu'il ne soit abîmé s'il y a de l'orage, il coûte très cher).

#### **IV. Observation au microscope (optimisation pour les MSC):**

Faire le film après 30min d'incubation en Fluo 4, éviter d'attendre plus longtemps car la durée de vie du Fluo 4 semble limitée (oscillations non détectables après 2 heures et diminuant avec le temps).

N.B. : même si la caméra est capable de faire une acquisition sur 1 ms d'exposition, le contrôleur des lampes laisse passer la lumière pendant à peu près 500 ms au minimum donc pour diminuer l'énergie lumineuse envoyée sur les cellules il faut utiliser un filtre

Il est possible d'utiliser un filtre de densité permettant d'atténuer l'intensité de la lumière fluorescente pour éviter la phototoxicité due à la prise d'images répétée pendant une longue période. Nous disposons de trois filtres de densité Thorlabs permettant de filtrer 50%, 90% et 99% de l'intensité lumineuse). Demander à Jean-Rémi Bertrand ou à Franck André pour monter ces filtres. Par exemple, l'utilisation du filtre 90% permet d'observer les oscillations calciques des MSC pendant plus d'une heure sans voir d'atténuation de ces oscillations.

##### **A. Réglages :**

Objectif 10x (permet de voir beaucoup de cellules, sans qu'elles soient trop petites et possède une grande profondeur de champ qui donne une image stable sur le temps)

Bining/résolution : 1388x1040 en noir et blanc (économise de la place et logiciels d'analyse fonctionnent avec images en noir et blanc), résolutions supérieures obtenues par scanning multiplie énormément le temps d'exposition empêchant la prise de photos fréquentes et pouvant potentiellement perturber les cellules ou photoblanchir le marqueur.

Gain : index de 1 à 3 (à évaluer selon l'expérience). Un index de plus de 3 génère une image de mauvaise qualité. Bien noter à chaque fois quel index a été utilisé pour pouvoir comparer les expériences.

Réalisation de la référence du noir (Black reference) : cliquer sur Live Properties, puis général, puis black reference (il faut faire ce réglage sur une image noire en mettant la tirette de gauche sur la position permettant de voir l'image dans les oculaires). Ce réglage permet de corriger les pixels morts de la caméra.

Temps d'expositions :

Hoechst 33342 : 500ms (filtre HCA)

Fluo 4 : 500ms (filtre FITC)

N.B. : ce sont les temps minimaux dans l'installation actuelle mais s'il est possible de faire moins long à l'avenir (si du nouveau matériel est installé), il vaut mieux raccourcir ces temps.

1 photo toutes les 10 à 15s

Filmer sur au moins 15 à 30 min

Enregistrer Stack en .zvi en 48 bit RGB Color (format d'origine)

## V. Démontage du dispositif

Les puces doivent être nettoyées à l'eau distillée en utilisant un mouchoir « KimTech » qui ne laissera pas de poussières de papier dans le canal. Eviter l'alcool qui risque de fixer les débris cellulaires. Possibilité de laisser tremper les puces dans de la tripsine pour essayer de les nettoyer sans risquer d'abimer l'or.

Pour le nettoyage du système :

1. enlever le milieu qui était autour avec un papier KimTech (qui ne laisse pas de particules et ne raye pas),
2. enlever la lamelle en s'aidant d'une aiguille dont le bout est recourbé (**attention de ne pas rayer les pistes**),
3. tamponner la puce au niveau des électrodes avec un KimTech sec (**ne pas frotter**),
4. imbiber le Kimtech avec de l'eau distillée et tamponner toute la puce pour retirer les traces de milieu,
5. sécher le dispositif en tamponnant avec un papier KimTech sec.

Déconnecter les câbles du boîtier beige qui contrôle le mouvement.

Déconnecter le câble SMA du support en cuivre.

Dévisser les vis du support en cuivre et l'enlever délicatement pour le ranger dans la boîte en plastique transparent collée sur le chariot roulant. Fermer cette boîte avec le couvercle pour éviter que des objets puissent tomber sur les puces et les casser.

**LE BRAS DOIT ÊTRE DÉMONTÉ À DEUX.** Une personne tient le bras pendant que l'autre dévisse les vis et suit le premier avec les câbles. Le bras doit être placé sur l'étagé du bas du charriot pour être sûr que personne ne pose rien dessus qui pourrait l'abimer.

Remonter la platine du microscope avec les trois vis.  
Eteindre le microscope.

## VI. Changement de puce

**Cette étape doit être faite avec beaucoup de minutie car c'est la partie la plus fragile de tout le montage.**

Caler le support pour qu'il ne bouge pas (mettre quelque chose soit la partie la plus fine du dispositif, celle où il n'y a pas la grosse pièce métallique pour fixer le dispositif au bras du microscope).

Dévisser les petites vis en plastique blanc qui retiennent les pattes de cuivre faisant le contact. **Mettre ses doigts entre les vis et la puce pour que les doigts retiennent le tournevis si celui-ci ripe (ce qui arrive souvent car la tête des vis est bombée).**

Enlever les pattes de cuivre avec une pince en faisant attention de ne pas rayer les pistes.

Dévisser les vis du pont (toujours en mettant sa main pour protéger la puce au cas où le tournevis ripe.

Faire glisser le pont.

Enlever délicatement la puce en poussant pas le bas.

**Attention, la puce peut être un peu collée au support à cause de l'isolant en silicone ou de gouttes de milieu qui seraient passées entre ces deux pièces. Dans ce cas, il faut appuyer de manière très homogène sur toute la surface de la puce pour ne pas concentrer toute la pression sur une seule zone, ce qui risquerait de casser la puce.**

Nettoyer la puce et le support pour enlever le silicone avec un KimTech.

Avant de placer la nouvelle puce, mettre une goutte de silicone (pâte B 431 Rhodia) avec un cône (qui sert de pinceau) sur le support en cuivre au niveau de la zone qui sera recouverte pour le pont. Il peut y avoir des claquages dans cette zone s'il y a de l'air au lieu de l'isolant.

Glisser la puce dans le creux du support pour que le silicone remonte un peu et fasse un bourrelet.

Remettre le pont en place et visser (toujours en faisant attention à ce que le tournevis ne puisse pas riper sur les pistes).

Remettre les pattes en cuivre en faisant attention à ne pas mettre d'isolant sur les extrémités en les mettant en place (sinon le contact ne se fera plus).

Visser les vis sur les pattes jusqu'à ce qu'il y ait contact entre les pattes et la puce mais pas plus (sinon les pattes s'écrasent et les extrémités se relèvent ce qui peut empêcher le contact). Il faut juste que les pattes soient immobilisées mais il ne faut pas forcer.

Vérifier que le courant passe avec le multimètre.

## **VII. Analyse des images**

### **A. Exporter les images**

Exporter en TIF sous axiovision (cliquer sur Fichier, puis Export) :

Mode « Tous »

**NE PAS** utiliser les couleurs pour les canaux (image couleur inutilisable par le programme d'analyse après)

Cocher « Utiliser le nom des canaux »

**NE PAS** cocher « générer des images fusionnées »

**NE PAS** cocher « générer uniquement des images fusionnées »

Compression 0%

**NE PAS** cocher « Echelle de gris » (perte de résolution possible)

**NE PAS convertir en 8bit** (perte de résolution entraînant un effet d'escalier dans les graphs après analyse)

**NE PAS** cocher « appliquer le rendu » (évite d'avoir des images d'intensités variables si des modifications du Gamma/luminosité/contrastes ont été faites)

**NE PAS** cocher « inscrire les annotations » (créer des objets qui perturberont le logiciel d'analyse)

### **B. Détourage des noyaux**

Utiliser le logiciel CellProfiler

Cell Profiler peut détourer les noyaux, les cellules et le cytoplasme. Cependant le détourage des cellules n'est pas parfait et la zone détournée est plus ou moins grande en fonction de

l'intensité de fluorescence. L'analyse des oscillations de calcium se fait sur le noyau repéré grâce au Hoechst 33342 car il y a moins de variabilité que lors du détournage du cytoplasme (le détournage change beaucoup selon l'intensité de fluorescence puisqu'il y a un seuil). Pour détourner les cellules etc, charger le pipeline « Pipeline Detournage noyau ».

Load Pipeline « Pipeline Detournage noyau »

Sélectionner les bons « Input folder » (où se trouvent les images exportées sous AxioVision) et « Output folder » (où les résultats doivent être placés).

Attention il peut y avoir des extensions .TIF et .tiff et il faut que l'extension du fichier à traiter soit exactement la même que celle notée dans le module Load images (modifier dans ce module si ce n'est pas identique, ne pas modifier l'extension du fichier à traiter).

Faire d'abord un test run en affichant l'étape Identify Primary Object pour vérifier que les paramètres de détection des noyaux sont optimaux. Les modifier si nécessaire. Changer les diamètres min et max si certains noyaux sont exclus car trop gros ou trop petits. Diminuer le « threshold correction factor » si aucun noyau n'est détecté (1.0), l'augmenter si trop de faux positifs sont détectés (1.6)

Une fois les paramètres au point, annuler le test run et cliquer sur « Analyze images »

L'analyse prend environ 5 min pour 10 images (soit 45min pour un film de 15min avec une image toutes les 10s, soit 90 images)

Le programme crée des images tif du détournage des noyaux au cours du temps visibles sous XnView ainsi que des fichiers de données en .csv visibles sous Excel et utilisables par Grapher et Matlab. Le fichier Image.csv contient les infos relatives à la précision du détournage (nombre de noyaux comptés, perdus, apparus, etc.) et le fichier Nuclei.csv les intensités en Fluo 4 des noyaux au cours du temps.

**NE SURTOUT PAS METTRE D'ACCENTS OU DE CARACTÈRES SPÉCIAUX DANS LE CHEMIN DES FICHIERS D'ENTREE OU DE SORTIE SINON CELL PROFILER PLANTE.**

Note : Le programme Matlab SpectralAnalysis filtre les données, il retire toutes les cellules qui sont apparues après la première image et aussi les cellules qui n'ont pas le bon nombre de mesures (N.B. : une cellule qui serait comptée 2 fois sur une image et 0 sur une autre aurait malgré tout le bon nombre de mesures et serait gardée, désorganisant toute la matrice et les résultats).

Il est important de vérifier l'absence de doublons dans la matrice « sorting » sous Matlab (fait automatiquement par le programme).



## VIII. Analyse des données et tracé des courbes

Il est plus simple d'utiliser Matlab pour tracer les courbes de profils calciques mais il est aussi possible d'utiliser Grapher donc les deux possibilités sont décrites ici.

### A. Sous Grapher

Ouvrir le fichier « Template Oscillations Calcium.grf » (modèle sous Grapher).

Sélectionner le fichier Nuclei.csv à analyser et cocher « Use this worksheet for remaining items » (les 89 graphs préfaits du modèle). Le séparateur n'est pas reconnu par Grapher et les données mises en une seule colonne.

Ouvrir le fichier Nuclei.csv sous Excel.

Remplacer tous les points par des virgules (en faisant un « remplacer » . par ,) et copier les données dans Grapher à la place des anciennes. Dans Grapher, sélectionner tous les Plots et modifier le « Step row value » en fonction du nombre de cellules comptées. Modifier les propriétés de l'axe (Tick Labels) cliquer sur Date/time settings et changer l'Axis increment si besoin (0.1 pour des photos prises toutes les 10s et 0.06666 pour toutes les 15s).

Cette procédure permet d'obtenir un graphique où les courbes des profils calciques de toutes les cellules de l'expérience sont représentées. Il est ensuite possible de cocher ou décocher certaines courbes pour les analyser en détail.

### B. Sous Matlab en utilisant le programme d'analyse de fréquences par transformée de Fourier sous Matlab

Un programme d'analyse de fréquence, nommé SpectralAnalysis-v3, a été modifié par Franck André et lors de l'analyse des suivis de calcium nous l'utilisons seulement partiellement.

Placer le fichier DefaultOUT\_Nuclei.csv dans le répertoire du programme Matlab. Exécuter le fichier SpectralAnalysis.m sous Matlab (Au cours du programme, appuyer sur « Entrée » ou cliquer sur OK pour passer à l'étape suivante).

Dans la fenêtre qui apparaît :

- vérifier que le délai entre chaque image est bien le bon (10s ou 15s, etc)
- Ouvrir le fichier DefaultOUT\_Nuclei.csv sous Excel et regarder le nombre de lignes et le renseigner dans la 3<sup>ème</sup> ligne de la fenêtre pop-up du programme Matlab. Il faut mettre ce nombre moins 1 dans la fenêtre de dialogue (car le programme commence par 0 alors que les lignes d'Excel commence par 1).



Le logiciel ouvre une fenêtre avec une courbe affichée. Cliquer sur la croix pour fermer cette fenêtre et éviter que la suite du programme ne se déroule. Toutes les courbes s'affichent sur un même graph. Sauvegarder en .fig.

Cette procédure génère donc un fichier (.fig) affichant toutes les courbes des profils calciques de toutes les cellules de l'expérience. Il est ensuite possible de cocher ou décocher certaines courbes pour les analyser en détail.